



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 796**

51 Int. Cl.:

C09B 1/20 (2006.01)

C09B 1/26 (2006.01)

C09B 62/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06725379 .9**

96 Fecha de presentación : **29.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1866379**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2007**

54

Título: **Adsorbentes que comprenden ligandos de colorantes de antraquinona para la separación de materiales biológicos.**

30

Prioridad: **08.04.2005 EP 05102776**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.10.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2011

73

Titular/es: **BASF SE**
67056 Ludwigshafen, DE

72

Inventor/es: **Ekkundi, Vadiraj, Subbanna;**
Punekar, Narayan, S.;
Fondekar, Kamalesh, Pai;
Roentgen, Georg;
Korde, Shilpa, S.;
Shinde, Ajit, B. y
Moorthy, Masana

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 366 796 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Adsorbentes que comprenden ligandos de colorantes de antraquinona para la separación de materiales biológicos.

La presente invención se relaciona con un proceso para la separación o purificación de materiales biológicos utilizando adsorbentes, que comprenden ligandos de colorantes de antraquinona, un proceso para la preparación de los adsorbentes y los adsorbentes.

Los colorantes reactivos son productos bien establecidos ampliamente utilizados en la industria de los textiles para la coloración de textiles celulósicos tales como algodón o viscosa. La molécula de un tal colorante reactivo puede verse como constituida de dos unidades entrelazadas cada una de las cuales tiene una función distinta. Una unidad es el cromóforo cuya función es impartir el color deseado y otras propiedades tintóreas al textil. La otra unidad es el grupo reactivo a la fibra, al cual, bajo condiciones de aplicación bien establecidas, reacciona químicamente con la celulosa para enlazar de forma covalente las moléculas de colorante al textil con el fin de producir un material teñido que es altamente resistente al proceso de lavado.

Mientras que los colorantes reactivos se desarrollaron inicialmente para resolver ciertos problemas encontrados en la tinte y impresión de materiales textiles celulósicos, a lo largo de los años han demostrado poseer propiedades que los hacen útiles por fuera del campo de la coloración textil.

Es bien conocido, por ejemplo, a partir de las patentes de los Estados Unidos N°s 4,016,149 y 4,546,161, que estos colorantes pueden unirse por técnicas similares a sustratos de carbohidratos, tales como polímeros y copolímeros derivados de agarosa, dextrosa, dextranos, etc. Los productos de reacción de tales sustratos de carbohidratos y ciertos colorantes reactivos disponibles comercialmente se han utilizado en cromatografía de afinidad como adsorbentes para la separación o purificación cromatográfica de ciertos materiales proteínicos. Entre los colorantes textiles comerciales, que han sido utilizados como ligandos para separación de proteínas o enzimas, hay ciertos colorantes de antraquinona azules que comprenden una unidad estructural monoclorotriazina, tal como C.I. Azul Reactivo 2 (Cibacron Blue 3GA), C.I. Azul Reactivo 5 y C.I. Azul Reactivo 49.

La US 6,638,740 divulga un proceso para la purificación de la proteína albúmina de suero humano por cromatografía de afinidad utilizando una resina que comprende un colorante inmovilizado del tipo Azul Reactivo, por ejemplo Azul Reactivo 2. Se proporciona albúmina altamente purificada. Sin embargo, ese documento se relaciona solamente con la purificación de dicha proteína individual.

La cromatografía de afinidad se basa en las afinidades diferenciales de las proteínas o enzimas por los ligandos de la fase estacionaria del adsorbente y crecientemente ha demostrado ser crucial en áreas de aplicación de alto nivel tales como productos biofarmacéuticos y de diagnóstico tal como se describe, por ejemplo, en WO 2004052870. La naturaleza de la interacción puede ser puentes de hidrógeno, fuerzas electroestáticas, apilamiento como resultado de geometría favorable o cualquier otro aspecto que promueva la relación ligando-objetivo. La interacción ligando-objetivo debería ser suficientemente fuerte para permitir el retiro de otras moléculas contaminantes de una muestra a la vez que mantiene el complejo ligando-objetivo intacto, esto es, las proteínas que tengan afinidad a los ligandos se enlazan a la matriz mientras que otras sin afinidad son lavadas. Las proteínas enlazadas pueden ser eluidas selectivamente bajo condiciones de pH, fuerza iónica y reguladores variables, tal como se describe, por ejemplo en P.D.G. Dean, W.S. Johnson y F.A. Middle (Ed), *Affinity Chromatography: A Practical Approach*, 1982. La mezcla de proteínas puede ser sometida a separación por agitación o pasando a través de una columna con el adsorbente.

La cromatografía de afinidad ha demostrado ser ventajosa en el fraccionamiento de sangre para captura fina y rápida de proteínas de las fracciones del plasma. La cromatografía de afinidad se aplica a las fracciones del plasma prepurificado por fraccionamiento clásico con etanol y/o por cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de afinidad está siendo utilizada en la producción industrial de diversos productos del plasma, tales como concentrados del factor VIII, factor IX, factor de von Willebrand, proteína C y Antitrombina III tal como se encuentra, por ejemplo, en T. Burnouf y M. Radosevich, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2001, 49, 575.

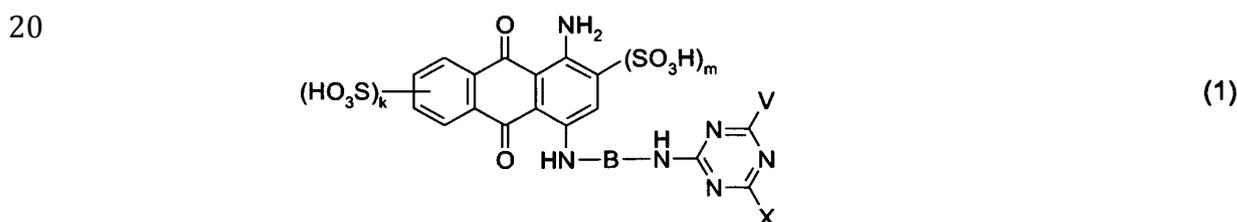
El Azul Cibacron 3GA ha sido bien estudiado en cuanto a sus interacciones con diversas proteínas y enzimas. Se ha observado que el colorante imita a la unidad estructural NAD^+ y por lo tanto interactúa con las proteínas y enzimas que reconocen este sitio tal como lo describe, por ejemplo, S. Subramanian, *CRC Critical Rev. Biochem.*, 1984, 16, 169. Se ha purificado albúmina exitosamente utilizando Azul de Cibacron 3GA inmovilizado a gran escala como se sabe, por ejemplo, a partir de M. Allary, J. Saint-Blancard, E. Boschetti y P. Girot, *Bioseparation*, 1991, 2, 167. El fraccionamiento de 27 proteínas de plasma se ha llevado a cabo con la ayuda de la cromatografía de afinidad utilizando Azul Cibacron 3GA inmovilizado sobre perlas de agarosa entrecruzada con un gradiente de pH como se describe, por ejemplo, en E. Gianazza y P. Arnaud, *Biochem. J.*, 1982, 201, 129. La purificación de proteasa de serinas sobre Sefarosa Azul (Azul Cibacron 3GA inmovilizado sobre agarosa) también ha sido reportada. Se conoce, por ejemplo, de C. Koch, L. Borg, K. Skjoldt y G. Hoven, *J. Chromatogr. B.*, 1998, 718, 41 que la interacción de las proteasas de serina con Sefarosa Azul involucra el sitio activo de la enzima.

5 Los avances en biotecnología como la tecnología de fagos y el diseño ayudado por ordenador de ligandos artificiales ha llevado a desarrollos adicionales en la aplicación de cromatografía de afinidad para la purificación de proteínas tal como se describe, por ejemplo, en C.R. Lowe, A.R. Lowe y G. Gupta, J. Biochem. Biophys. Metods, 2001, 49, 561. Diversos ligandos sintéticos hechos a la medida, además de los bioligandos utilizados tradicionalmente tales como heparina, gelatina, proteína A y proteína C, han provisto una productividad mejorada de las proteínas del plasma.

10 La aplicación de técnicas de ligandos artificiales para la purificación industrial de proteínas no ha sido impulsada hasta un nivel mayor y ha estado limitada primariamente al uso de Azul Cibacron 3GA. Puesto que el principio de la cromatografía de afinidad se basa en el fenómeno del reconocimiento molecular, las variaciones estructurales del ligando juegan un papel vital bien sea en la estabilización o desestabilización de las interacciones proteína-colorante. Véase, por ejemplo, N. Lindner, R. Jeffcoat, C. Lowe, J. Chromatogr. 1989, 473, 227 y Y.D. Clonis, N.E. Labrou, V. Kotsira, C. Mazitsos, S. Melissis, G. Gogolas, J. Chromatogr. A, 2000, 891, 33. Las interacciones secundarias con un complejo ternario podían también haber producido un efecto profundo al exhibir afinidad hacia una proteína específica tal como se describe, por ejemplo, en N.E. Labrou, E. Eliopoulos, Y.D. Clonis, Biochem J., 1996,315,695.

15 De acuerdo con lo anterior, hay una necesidad de proveer adsorbentes colorante-ligando sintetizables fácilmente para abordar diversos problemas de separación o purificación y para incrementar el alcance de los métodos confiables para la purificación de proteínas.

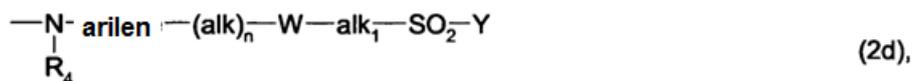
La presente invención se relaciona con un proceso para la separación de materiales biológicos, donde se usa un adsorbente, que comprende un producto de reacción de un compuesto de formula



25 Y un sustrato que tiene un grupo capaz de reaccionar con un grupo reactivo en dicho compuesto de la formula (1) para formar un enlace covalente en el cual B es Radical C2-C12alquileo, que puede estar interrumpido por 1, 2 o 3 miembros del grupo consistente en -NR₁- o -O y es no sustituido o sustituido por hidroxilo, sulfo, sulfato, ciano o carboxilo, R₁ es hidrógeno o C₁-C₄alquilo, o B es un radical C5-C9cicloalquileo, Radical C1-C4alquilen-C5-C9cicloalquileo o Radical C1-C4alquilen-C5-C9cicloalquilen-C1-C4alquileo, los cuales están no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, sulfo, halógeno o carboxilo, o un radical fenileno, Radical C1-C4alquilen-fenileno o Radical C1-C4alquilen-fenilen-C1-C4alquileo, los cuales están no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, C₂-C₄alcanoilamino, sulfo, halógeno o carboxilo, V es un sustituyente reactivo a materiales no fibrosos o es un sustituyente reactivo a las fibras de fórmula

30

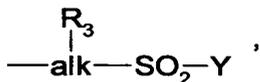




5



donde R₂ es hidrógeno o C1-C4 alquilo no sustituido o sustituido o un radical

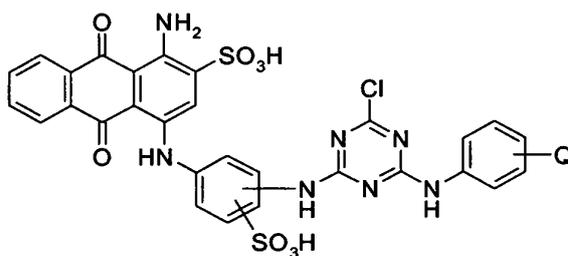


10

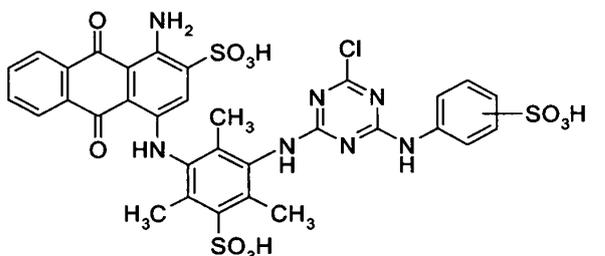
R₃ es hidrógeno, hidroxilo, sulfato, sulfato, carboxi, ciano, halógeno, C₁-C₄alcoxycarbonilo, C₁-C₄-alcanoiloxi, carbamoilo o un grupo -SO₂-Y, R₄ es hidrógeno o C₁-C₄alquilo, alk y alk₁ son independientemente uno del otro C₁-C₆ alquilenos lineales o ramificados, arileno es un radical fenileno o naftileno el cual es no sustituido o sustituido por sulfato, carboxi, hidroxilo, C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi o por halógeno, Y es vinilo o un radical -CH₂-CH₂-U y U es un grupo saliente, Y₁ es un grupo -CH(Hal)-CH₂(Hal) o -C(Hal)=CH₂ donde Hal es cloro o bromo, W es un grupo -SO₂-NR₄-, -CONR₄- o -NR₄CO- donde R₄ es como se definió más arriba, Q es un radical -O- o -NR₄- donde R₄ es como se definió más arriba, y n es un número 0 o 1, X es halógeno, y k y m son independientemente uno del otro un número 0 o 1 y la suma de k+m es 1 o 2, con la excepción de un adsorbente, que comprende un compuesto de la fórmula

15

20



25



Donde Q es sulfato o carboxi.

30

Como C₁-C₄alquilo en el radical B entran en consideración, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, tert-butilo o isobutilo, preferiblemente metilo o etilo, especialmente metilo.

Como C₁-C₄alcoxi en el radical B entran en consideración, por ejemplo, metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi,

sec-butoxi, tert-butoxi y isobutoxi, preferiblemente metoxi o etoxi, especialmente metoxi.

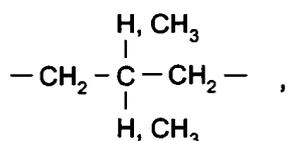
Como halógeno en el radical B entran en consideración, por ejemplo, flúor, cloro y bromo, preferiblemente cloro o bromo, especialmente cloro.

5 Como C₂-C₄alcanoilamino en el radical B entran en consideración, por ejemplo, acetilamino o propionilamino, preferiblemente acetilamino.

Preferiblemente R₁ es hidrógeno o metilo.

Un radical alquileo B es preferiblemente un radical C₂-C₆alquileo, que puede estar interrumpido por 1, 2 o 3 miembros -O- y es no sustituido o sustituido por hidroxil o sulfato. Se prefieren los radicales no sustituidos, en particular el radical de la fórmula

10



Los radicales de las fórmulas -(CH₂)₃- y -CH₂-C(CH₃)₂-CH₂- son de particular interés.

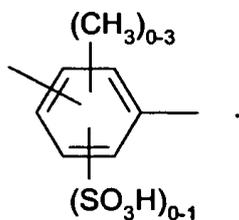
15

Radicales B preferidos que contienen cicloalquileo son los correspondientes radicales que contienen ciclohexileno, los cuales, en particular, son no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo. Un radical ciclohexileno o un radical metilen-ciclohexileno el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo, en particular un radical metilen-ciclohexileno el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo, se prefiere aquí en particular.

20

Radicales B preferidos que contienen fenileno los radicales correspondientes que están no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, halógeno o sulfo. Fenileno o metilen-fenilen-metileno los cuales están no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, halógeno o sulfo son preferidos en particular. Radicales especialmente preferidos son los de la fórmula

25



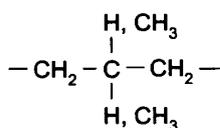
30

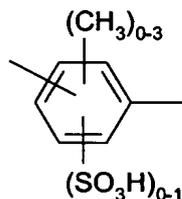
B es preferiblemente un radical C₂-C₆alquileo, que puede estar interrumpido por 1, 2 o 3 miembros -O- y es no sustituido o sustituido por hidroxil o sulfato, o un radical ciclohexileno o un radical metilen-ciclohexileno el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo, o a fenileno o metilen-fenilen-metileno radical el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, halógeno o sulfo.

B es en particular preferiblemente un radical C₂-C₆alquileo, un radical metilen-ciclohexileno el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo, o un radical fenileno o metilen-fenilen-metileno el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, halógeno o sulfo.

B es de forma especial preferiblemente

35





5

Como $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquilo para R_2 y R_4 , cada uno independientemente de los otros, entran en consideración, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, tert-butilo y isobutilo, preferiblemente metilo y etilo, y especialmente metilo. The mentioned radical R_2 is unsubstituted o substituted, por ejemplo by halógeno, hidroxilo, ciano, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcoxi, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcoxicarbonilo, carboxi, sulfamoilo, sulfo o por sulfato, preferiblemente by hidroxilo, sulfo, sulfato, carboxi o por ciano. Los radicales no sustituidos are preferred.

10

Cuando Y es un radical $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-U}$, el grupo saliente U puede ser, por ejemplo, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{F}$, $-\text{OSO}_3\text{H}$ $-\text{SSO}_3\text{H}$ $-\text{OCOCH}_3$, OPO_3H_2 , $-\text{OCO}-\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{OSO}_2\text{-C}_1\text{-C}_4$ alquilo o $-\text{OSO}_2\text{-N}(\text{C}_1\text{-C}_4\text{alquil})_2$. U es preferiblemente un grupo de fórmula $-\text{Cl}$, $-\text{OSO}_3\text{H}$ $-\text{SSO}_3\text{H}$, $-\text{OCO}-\text{CH}_3$, $-\text{OCO}-\text{C}_6\text{H}_5$ o $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, especialmente $-\text{Cl}$ o $-\text{OSO}_3\text{H}$, y más especialmente $-\text{OSO}_3\text{H}$.

Y es preferiblemente vinilo, β -cloroetilo, β -sulfatoetilo, β -tiosulfatoetilo, β -acetoxietilo, β -fenoxietilo o β -fosfatoetilo,

15

especialmente β -cloroetilo, β -sulfatoetilo o vinilo, más especialmente β -sulfatoetilo o vinilo, y muy especialmente vinilo.

Hal es preferiblemente bromo.

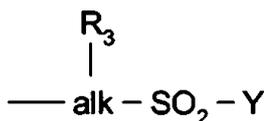
alk y alk1, cada uno independientemente del otro, son, por ejemplo, metileno, 1,2-etileno, 1,3-propileno, 1,4-butileno, 1,5-pentileno, 1,6-hexileno o un isómeros ramificado de los mismos alk y alk1, cada uno independientemente del otro, son preferiblemente un radical $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquilenos, y especialmente un radical etileno o propileno.

20

Significados preferidos de arileno son un radical 1,3- o 1,4-fenileno el cual es no sustituido o sustituido por sulfo, metilo o por metoxi, y especialmente un radical 1,3- o 1,4-fenileno no sustituido.

R_2 es preferiblemente hidrógeno, $\text{C}_1\text{-C}_4$ alquilo o un radical de fórmula

25



donde R_3 , Y y alk en cada caso son como se definió más arriba y tienen los significados preferidos dados más arriba. R_2 es especialmente hidrógeno, metilo o etilo, y muy especialmente hidrógeno.

R_3 es preferiblemente hidrógeno.

R_4 es preferiblemente hidrógeno, metilo o etilo, y especialmente hidrógeno.

30

La variable Q es preferiblemente $-\text{NH}-$ o $-\text{O}-$, y especialmente $-\text{O}-$.

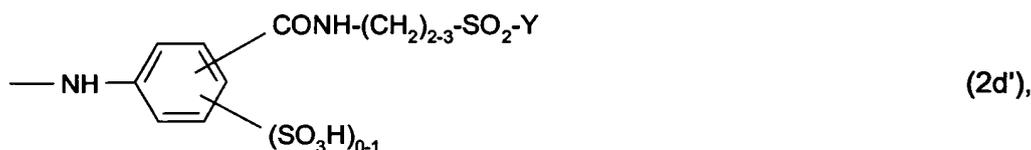
W es preferiblemente un grupo de fórmula $-\text{CONH}-$ o $-\text{NHCO}-$, especialmente el grupo de fórmula $-\text{CONH}-$.

La variable n es preferiblemente el número 0.

35

Sustituyentes preferidos reactivos a la fibra V de fórmulas (2a) a (2f) son aquéllos donde R_2 y R_3 son cada uno hidrógeno, R_4 es hidrógeno, metilo o etilo, Q es un radical $-\text{NH}-$ o $-\text{O}-$, W es el grupo $-\text{CONH}-$, alk y alk1 son independientemente uno del otro etileno o propileno, arileno es fenileno el cual es no sustituido o sustituido por metilo, metoxi o por sulfo, Y es vinilo, β -cloroetilo o β -sulfatoetilo, especialmente vinilo o β -sulfatoetilo, y muy especialmente vinilo, Y_1 is $-\text{CHBr}-\text{CH}_2\text{Br}$ o $-\text{CBr}=\text{CH}_2$ y n is el número 0; entre esos sustituyentes se da preferencia especial a los radicales de fórmulas (2c) y (2d).

Cuando V tiene el significado de un sustituyente reactivo a la fibra, se da preferencia muy especial a que V sea un grupo de fórmula



5 especialmente (2c'), donde Y es como se definió más arriba y tiene los significados preferidos dados más arriba.

En el radical de fórmula (2c'), el átomo de nitrógeno puede ser sustituido por metilo o etilo en vez de hidrógeno.

10 Cuando V es un sustituyente reactivo a materiales no fibrosos, puede ser, por ejemplo, hidroxilo; C₁-C₄alcoxi; C₁-C₄alquiltio el cual es no sustituido o sustituido por hidroxilo, carboxi o por sulfo; amino; amino mono- o di-sustituido por C₁-C₈alquilo, estando el alquilo no sustituido o sustituido adicionalmente por, por ejemplo, sulfo, sulfato, hidroxilo, carboxi o por fenilo, especialmente por sulfo o por hidroxilo, y estando no interrumpido o interrumpido por un radical -O-; ciclohexilamino el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo; morfolino; N-C₁-C₄alquil-N-fenilamino o fenilamino o naftilamino, estando el fenilo o naftilo no sustituido o sustituido por, por ejemplo, C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, carboxi, sulfo o por halógeno.

15 Ejemplos de sustituyentes adecuados no reactivos a la fibra V son amino, metilamino, etilamino, β-hidroxietilamino, 2-(β-hidroxietoxi)etilamino, N,N-di-β-hidroxietilamino, β-sulfoetilamino, ciclohexilamino, morfolino, o-, m- o p-clorofenilamino, o-, m- o p-metilfenilamino, o-, m- o p-metoxifenilamino, o-, m- o p-sulfofenilamino, disulfofenilamino, o-carboxifenilamino, 1- o 2-naftilamino, 1-sulfo-2-naftilamino, 4,8-disulfo-2-naftilamino, N-etil-N-fenilamino, N-metil-N-fenilamino, metoxi, etoxi, n- o iso-propoxi e hidroxilo.

20 Como un radical no reactivo a la fibra se da preferencia a V con el significado de hidroxilo; C₁-C₄alcoxi; C₁-C₄alquiltio el cual es no sustituido o sustituido por hidroxilo, carboxi o por sulfo; amino; N-mono- o N,N-di-C₁-C₄alquilamino, el cual es no sustituido o sustituido en la unidad estructural alquilo por hidroxilo, sulfato o por sulfo Y es no interrumpido o interrumpido por un radical -O-; morfolino; fenilamino o N-C₁-C₄alquil-N-fenilamino, donde each fenilo ring es no sustituido o sustituido por sulfo, carboxi, cloro, acetilamino, metilo o por metoxi y donde the alquilo es no sustituido o sustituido por hidroxilo, sulfo o por sulfato; o naftilamino el cual es no sustituido o sustituido por de 1 a 3 grupos sulfo.

25 Especialmente preferred as a non-fibre-reactive radical V corresponde a amino, N-mono- o N,N-di-C₁-C₄alquilamino el cual es no sustituido o sustituido en la unidad estructural alquilo por hidroxilo, sulfato o por sulfo Y es no interrumpido o interrumpido por un radical -O-, morfolino, fenilamino o N-C₁-C₄alquil-N-fenilamino el cual es no sustituido o sustituido en el anillo fenilo por sulfo, carboxi, cloro, acetilamino, metilo o por metoxi, o naftilamino el cual es no sustituido o sustituido por de 1 a 3 grupos sulfo.

30 Radicales no reactivos a la fibra especialmente importantes V son β-hidroxietilamino, 2-(β-hidroxietoxi)etilamino, N, N-di-β hidroxietilamino, β-sulfoetilamino, morfolino, 2-, 3- o 4-sulfofenilamino, 1-sulfonaft-2-il-amino o 3,7-disulfonaft-2-il-amino.

k es preferiblemente el número 0.

m es preferiblemente el número 1.

35 X es, por ejemplo, flúor, cloro o bromo, preferiblemente flúor o cloro, y especialmente cloro.

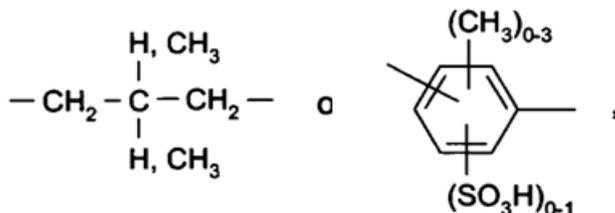
En una realización preferida de la presente invención el compuesto de fórmula (1) corresponde a un compuesto de

fórmula



5 donde B es un radical C₂-C₆alquileo, un radical metilen-ciclohexileno, el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo, o a fenileno o metilen-fenilen-metileno radical, el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, halógeno o sulfuro, V es amino, N-mono- o N,N-di-C₁-C₄alquilamino el cual es no sustituido o sustituido en la unidad estructural alquilo por hidroxilo, sulfato o por sulfuro Y es no interrumpido o interrumpido por un radical -O-, morfolino, fenilamino o N-C₁-C₄alquil-Nfenilamino el cual es no sustituido o sustituido en el anillo fenilo por sulfuro, carboxi, cloro, acetilamino, metilo o por metoxi, o naftilamino el cual es no sustituido o sustituido por de 1 a 3 grupos sulfuro, o V es un grupo de fórmula (2c') o (2d') as defined above.

10 En una realización preferida en particular de la presente invención el compuesto de fórmula (1) corresponde a un compuesto de fórmula (1a) como se indicó más arriba, donde B es un radical



15 Una variación estructural del compuesto de formula (1) puede tenerse en cuenta para problemas particulares de separación o purificación.

20 El sustrato o matriz usado para preparar los adsorbentes aplicados de acuerdo con la presente invención pueden ser sustancialmente insolubles en agua. Como ejemplos de los dichos sustratos pueden mencionarse polímeros acrílicos, tales como poliacrilamidas o hidroxialquilmetacrilatos, y copolímeros de estos materiales, óxidos metálicos, tales como zirconia, titania o alúmina, sílica o vidrio poroso, pero el soporte sólido insoluble en agua preferido es un sustrato polimérico que tiene una pluralidad de grupos hidroxilo a los cuales puede enlazarse el compuesto de formula (1) a través del grupo reactivo. Sustratos especialmente adecuados son carbohidratos y carbohidratos modificados. Ejemplos de un sustrato carbohidrato adecuado son agarosa, agarosa entrecruzada, dextrosa, dextranos y versiones modificadas de los mismos, tales como los que están disponible en forma de "Sephacrose" y geles de "Sephadex" ("Sephacrose" y "Sephadex" son marcas registradas de GE Healthcare) y están descritos en GB 1,540,165. Otros sustratos poliméricos son poliamidas. Sustratos especialmente preferidos son agarosa y agarosa entrecruzada.

25 Los adsorbentes aplicados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por técnicas estándar, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto de la formula (1) con un sustrato que tiene un grupo capaz de reaccionar con un grupo reactivo en dicho compuesto de la formula (1) para formar un enlace covalente, por ejemplo, un sustrato carbohidrato, en presencia de un agente de enlazamiento ácido, tal como un hidróxido o carbonato de metal alcalino, por ejemplo, hidróxido de sodio o carbonato de sodio, donde las variable se definen y se prefieren como se indicó mas arriba.

30 Los métodos para la preparación de tales adsorbentes y columnas cromatográficas que los contienen están bien documentados, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos N°s 4,016,149 y 4,546,16. Por lo tanto, estos documentos serán incorporados como referencia.

35 Como ya se indicó, el sustrato o matriz, por ejemplo, agarosa, agarosa entrecruzada, dextrosa o dextranos, puede modificarse adicionalmente mediante la introducción de espaciadores de longitud variable, ventajosamente, antes de enlazar covalentemente el compuesto de la formula (1) a los espaciadores. Los espaciadores pueden permitir la interacción incrementada de colorante-ligandos con el material proteináceo que va a ser purificado, debido a una accesibilidad mejorada de colorante-ligandos, mejorando por lo tanto la selectividad y la eficiencia de los adsorbentes.

40 La introducción de los espaciadores se lleva a cabo, por ejemplo, por tratamiento del sustrato con epiclorhidrina en

presencia de un agente enlazador ácido, tal como un hidróxido o carbonato de metal alcalino, por ejemplo hidróxido de sodio o carbonato de sodio, y subsecuentemente con una poliamina, bajo temperaturas adecuadas de, por ejemplo 20 a 80 °C, preferiblemente 20 a 50 °C.

5 Compuestos de poliamina adecuados para la introducción de espaciadores pueden seleccionarse del grupo consistente de poliaminas aromáticas, poliaminas alifáticas y poliaminas alicíclicas. Ejemplos típicos incluyen polivinilamina, polivinilimina, 1,2-etilendiamina, hidrazina, hidrazina-2-bis-(3-aminopropil)-amina, 1,4-diaminociclohexano, 3-amino-1-

10 metilaminopropano, N-hidroxi-etilendiamina, N-metil-bis-(3-aminopropil)-amina, tetraetilendiamina, 1,4-diaminobutano, 1,6-hexametilendiamina, 1,8-diaminooctano, 1-aminoetil-1,2-etilendiamina, dietilentriamina, tetraetilenpentamina, pentaetilenhexamina, fenilendiamina, tolulendiamina, 2,4,6-triaminotoluen-trihidrocloruros, 1,3,6-triaminonaftaleno, isoformondiamina, xililendiamina, xililendiamina hidrogenada, 4,4'-di-diaminofenilmetano, 4,4'-diaminodifenilmetano hidrogenado, y derivados de estos monómeros de poliamina.

Se prefieren las poliaminas alifáticas y/o alicíclicas. Se prefieren especialmente diaminas alifáticas y/o alicíclicas. Pueden mencionarse en particular la 1,4-diaminobutano, 1,6-hexametilendiamina y 1,8-diaminooctano. Las poliaminas pueden utilizarse individualmente o como mezclas de al menos dos poliaminas.

15 El material biológico puede ser cualquier material que se enlace específicamente a los compuestos de la fórmula (1) empleados en el proceso de la presente invención, por ejemplo, péptidos, polipéptidos, proteínas, nucleótidos, polinucleótidos, ácidos nucleicos, esteroides, lípidos, hormonas. En general sin embargo, la sustancia biológica o relacionada será una enz--ima, proteína o polipéptido, por ejemplo, albúmina, peptidasas, fosfatasas, quinasas tales como gliceroquinasas, exoquinasas o uroquinasas, nucleasas, tales como endonucleasas o ribonucleasas de restricción, 20 deshidrogenasas, tales como gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, deshidrogenasa de alcohol del hígado o glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, estearasas, sintetasas, proteínas de enlazamiento y receptores de ADN o ARN.

25 El adsorbente que comprende el compuesto de la fórmula (1) enlazado a un soporte sólido puede estar en la forma de una columna para propósitos de separación cromatográfica o en la forma de una membrana para permitir la separación que va a llevarse a cabo en un formato de separación por membrana.

La separación o proceso de purificación de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo tratando, por ejemplo, agitando, el material biológico en presencia del adsorbente que comprende el compuesto de la fórmula (1) en un ambiente acuoso de pH y fuerza iónica adecuados, separando el adsorbente, por ejemplo, por filtración, y eluyendo las proteínas enlazadas del adsorbente por una variación adecuada del pH y la fuerza iónica.

30 Ventajosamente, el proceso de separación o purificación de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo mediante cromatografía de afinidad, la cual comprende:

- 35
- a) La fase de contacto, donde una mezcla que contiene el material biológico se pone en contacto con el adsorbente que comprende el compuesto de la fórmula (1) retenido sobre una columna cromatográfica.
 - b) La fase de lavado, donde las especies no enlazantes se retiran del adsorbente que comprende el compuesto de la fórmula (1) haciendo pasar una solución de lavado a través del mismo, y
 - c) La fase de elución, donde una solución eluyente se pasa a través del adsorbente que comprende el compuesto de la fórmula (1) para recuperar el material biológico deseado detenido desde la columna.

Mediante la selección cuidadosa del material de enlazamiento, de la solución de lavado y de solución de elución puede lograrse una purificación en una etapa de mezclas complejas de material biológico.

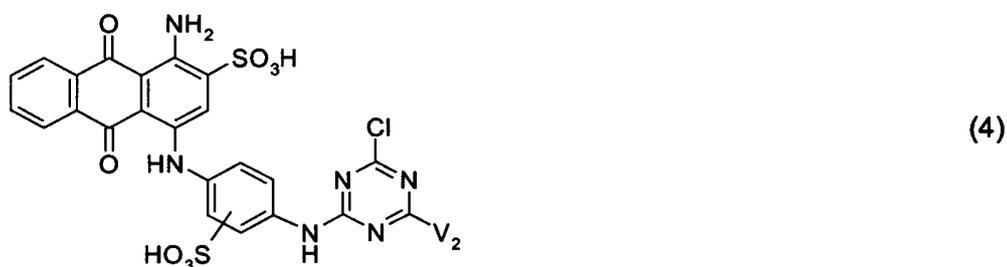
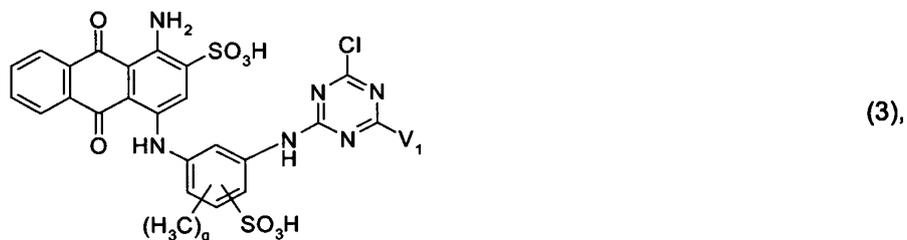
40 De acuerdo con otra aspecto de la presente invención se proporciona un adsorbente que comprende el aducto de un compuesto fórmula (1) tal como se definió más arriba y un sustrato que tiene un grupo capaz de reaccionar con un grupo reactivo en dicho compuesto de la fórmula (1) para formar un enlace covalente, donde las variables se definen y se prefieren como se indicó más arriba.

45 Los adsorbentes de acuerdo con la presente invención son materiales altamente puros, desprovistos de comportamiento de pérdida de colorante y contienen diversos niveles de concentraciones colorante-ligandos sobre la matriz. Adicionalmente, los adsorbentes de acuerdo con la presente invención son química y térmicamente estables y altamente selectivos y proporcionan diversas estructuras colorante-ligandos disponibles para selección en la cromatografía de afinidad colorante-ligando.

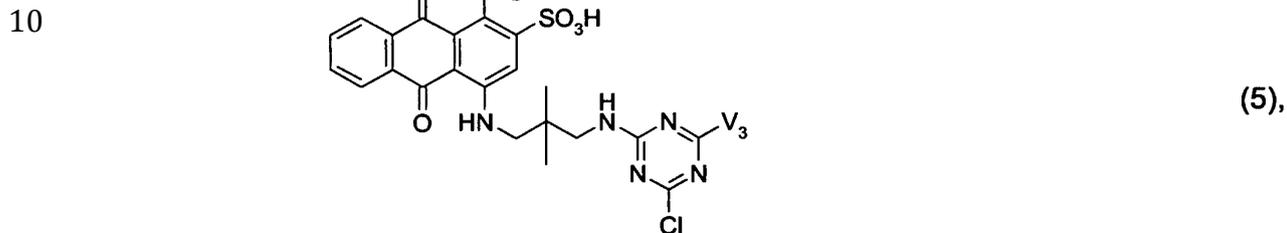
50 El rango de estructuras de colorante disponibles para la selección es un avance significativo en la cromatografía de afinidad colorante-ligando. Adicionalmente, la interacción con estas variantes estructurales podría involucrar el sitio activo de una proteína (T.Burnouf, H.Goubran, M. Radosevich, J. Chromatogr. B, 1998, 715, 65) o la interacción podría

ser en cualquier lugar de la proteína (B.M.Hayden y P.C.Engel, Eur. J. Biochem., 2001, 268, 1173). Un potencial para ambos modos de enlazamiento mediante el conjunto de adsorbentes los convierte en un recurso valioso en el desarrollo de protocolos de purificación de proteínas para casi cualquier proteína de interés.

5 Algunos de los colorantes-ligandos utilizados de acuerdo con la presente invención son nuevos. De acuerdo con lo anterior, la presente invención se relaciona también con los compuestos de las fórmulas



y

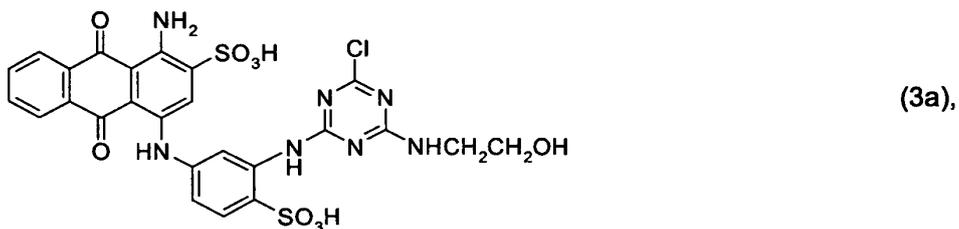


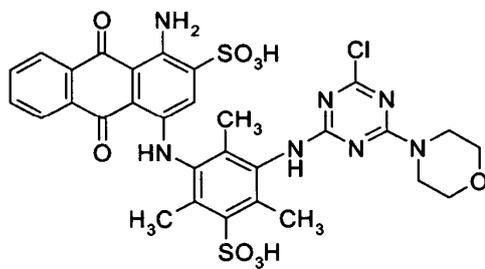
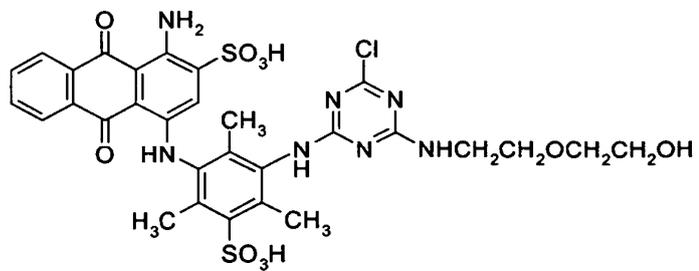
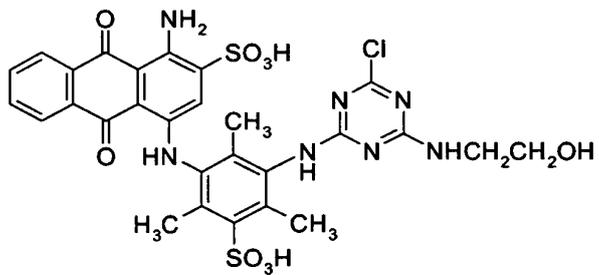
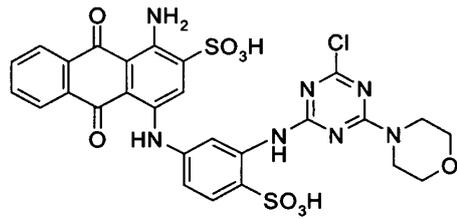
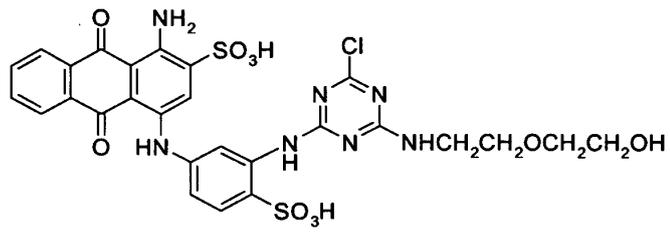
donde

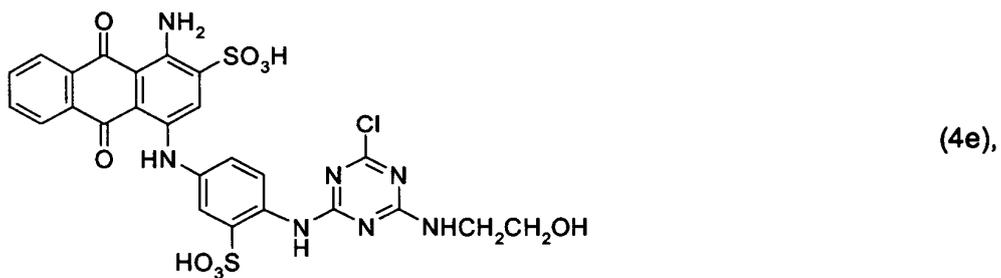
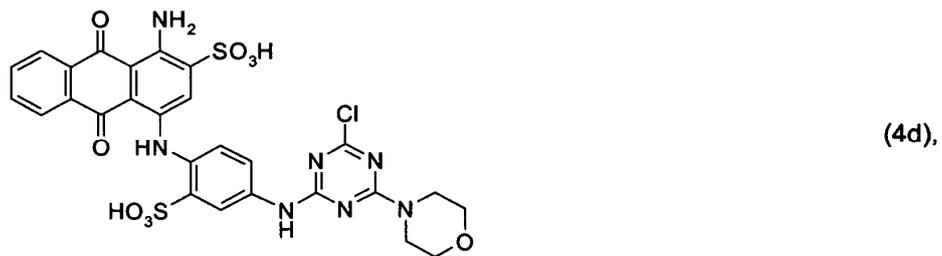
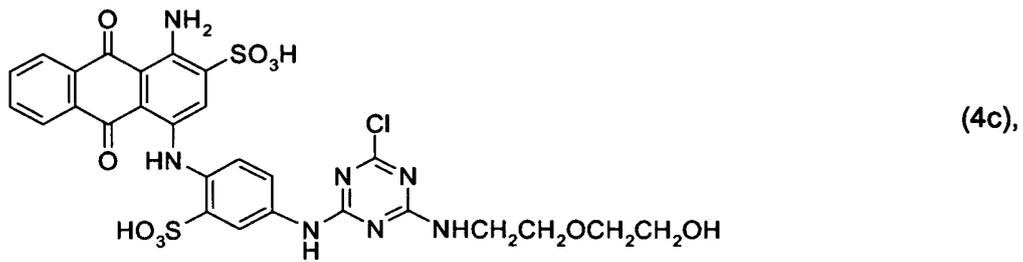
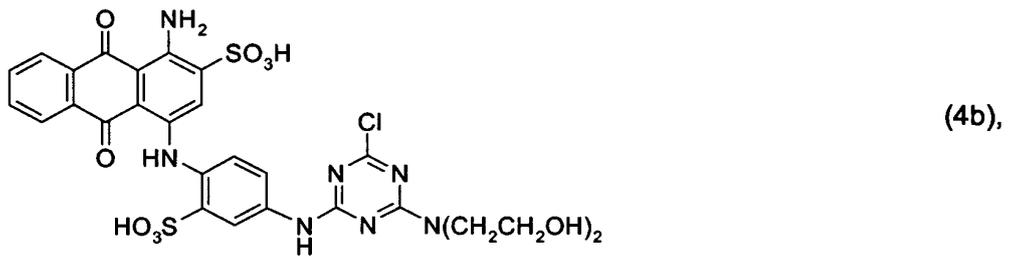
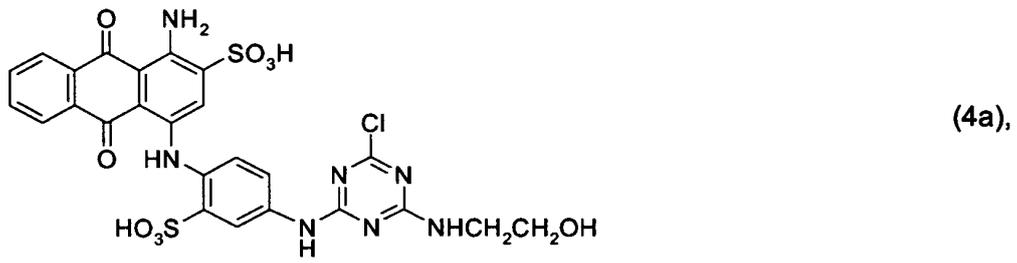
15 V1 is β-hidroxietilamino, 2-(β-hidroxietoxi)etilamino o morfolino, V2 y V3 cada uno independientemente del otro

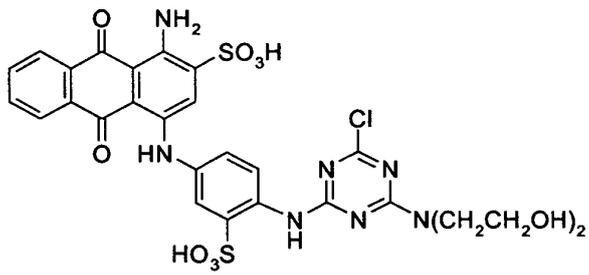
son β-hidroxietilamino, 2-(β-hidroxietoxi)etilamino, N,N-di-β-hidroxietilamino o morfolino, y Q es el número 0, 1, 2 o 3, preferiblemente 0 o 3.

Se prefieren los compuestos de las fórmulas

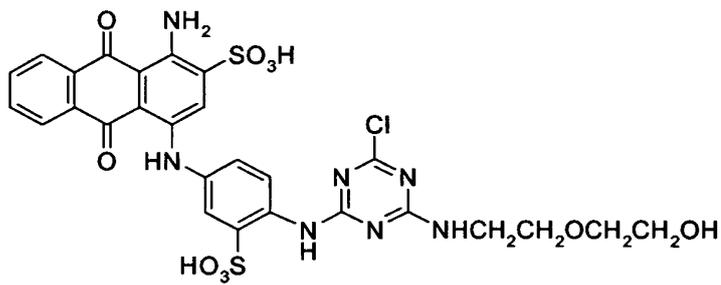




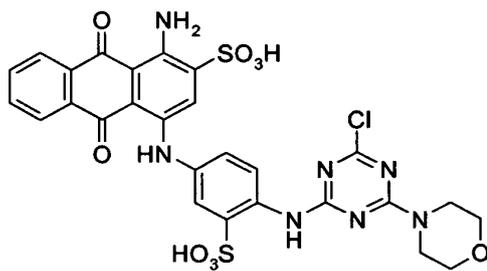




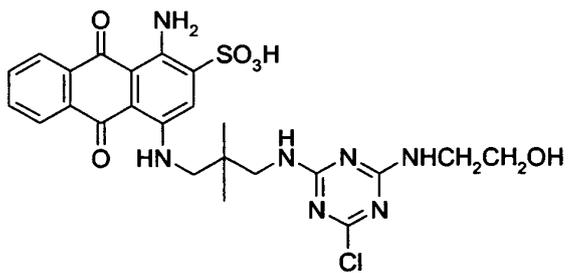
(4f),



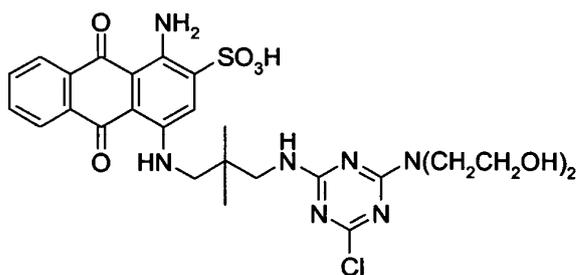
(4g),



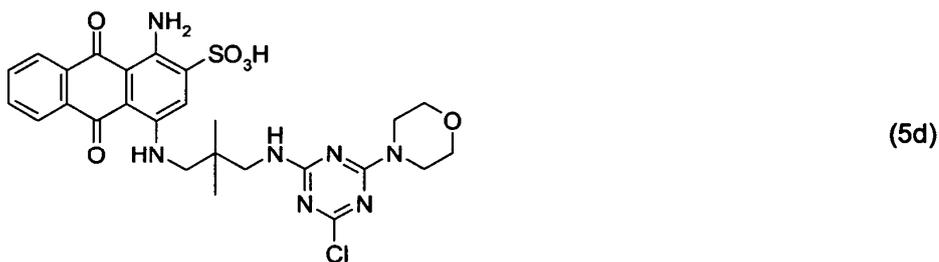
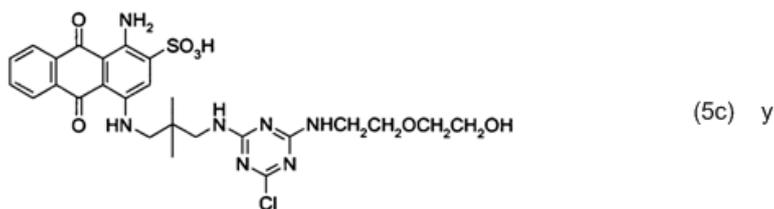
(4h),



(5a),



(5b),



Los colorantes-ligandos pueden prepararse de forma análoga a los procedimientos conocidos en la técnica.

5 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención. Las temperaturas se dan en grados Celsius. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso y el porcentaje se refiere al porcentaje en peso. Las partes en peso se relacionan con las partes en volumen en una proporción de quilogramos a litros.

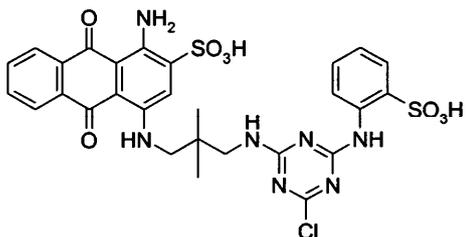
Preparación de los colorantes-ligandos

Ejemplo 1:

- 10 a) Se dispersan 20.17 partes de cloruro cianúrico en 100 partes de agua y 100 partes de hielo. Se disuelven en forma neutra 19.26 partes de ácido 2-aminobenceno sulfónico con hidróxido de sodio en 70 partes de agua. La solución neutra, así obtenida, se agrega a la dispersión anterior de cloruro cianúrico toda de una vez y el valor de pH se mantiene en 3 durante una hora por medio de una solución acuosa de hidróxido de sodio (30%). Subsecuentemente, se incrementa el valor de pH en etapas hasta 6 y se mantiene durante un par de horas por la adición gota a gota de una solución acuosa de hidróxido de sodio (30%). La temperatura se mantiene a 0-5°C durante unas pocas horas.
- 15 b) Se disuelven 40.35 partes del compuesto, al cual en la forma del ácido libre corresponde la fórmula



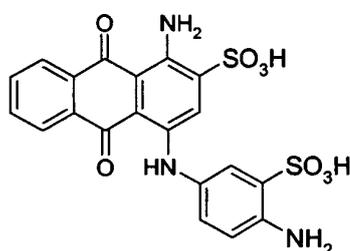
25 en 200 partes de agua y se agrega todo a la vez a la solución obtenida de acuerdo con la etapa (a). El valor de pH se eleva a 8.4-8.6 inmediatamente mediante la adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio (30%) y la temperatura se deja incrementar hasta 20°C. Estas condiciones se mantienen durante un par de horas. La mezcla de reacción se neutraliza, se libera de sales inorgánicas por diálisis y se concentra por evaporación. El producto se seca y se recolectan 94.3 g de un compuesto, el cual en la forma de un ácido libre corresponde la fórmula



(101).

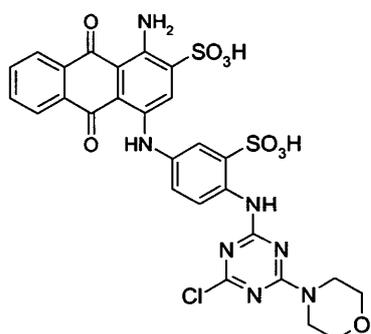
Ejemplo 2:

- a) Se dispersan 19.36 de cloruro cianúrico en 50 partes de agua y 60 partes de hielo. Se disuelven de forma neutra 48.95 partes de un compuesto, el cual en la forma de ácido libre corresponde a la fórmula



con hidróxido de sodio en 350 partes de agua. La solución neutra, así obtenida, se agrega a la dispersión anterior de cloruro cianúrico a lo largo de 20 minutos a la vez que se mantiene el valor de pH en 5 por adición gota a gota de una solución acuosa de hidróxido de sodio (30%). La mezcla de reacción se mantiene en pH 6 y la temperatura se mantiene a 0-2 °C durante un par de horas.

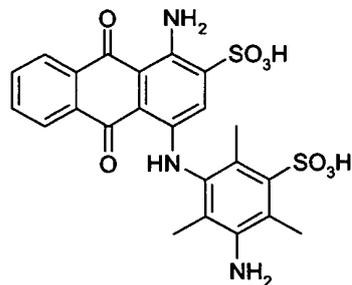
- b) Se agregan 9.58 parte de morfolina a la solución obtenida de acuerdo con la etapa (a). El valor de pH se eleva a 9 inmediatamente por adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio (30%) y la temperatura se incrementa a 60° C. Estas condiciones se mantienen durante un par de horas. Se neutraliza la mezcla de reacción, se libera de sales inorgánicas por diálisis y se concentra por evaporación. El producto se seca y se recolectan 93.1 g de un compuesto el cual en la forma del ácido libre corresponde a la fórmula



(102).

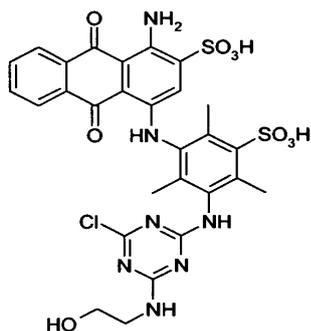
 $(\lambda_{\max}: 624 \text{ nm})$ **Ejemplo 3:**

- a) Se dispersan 12.9 partes de cloruro cianúrico en 50 partes de agua y 50 partes de hielo. Se disuelven en forma neutra 38.42 partes de un compuesto, el cual en la forma del ácido libre corresponde a la fórmula



con hidróxido de sodio en 365 partes de agua. La solución neutra, así obtenida, se agrega a la dispersión anterior de cloruro cianúrico durante 10 minutos a la vez que se mantiene el valor de pH en 5 por adición gota a gota de una solución acuosa de hidróxido de sodio (30%). La mezcla de reacción se mantiene a pH 5 y la temperatura se mantiene a 0° C durante un par de horas

- b) Se agregan 4.70 partes de etanolamina a la solución obtenida de acuerdo con la etapa (a). El valor de pH se eleva a 9 inmediatamente por adición de una solución acuosa de soda (20%) y la temperatura se incrementa a 50 °C. Estas condiciones se mantienen durante un par de horas.
- c) Se agregan 35 partes de cloruro de sodio a 1750 partes de la mezcla de reacción. Después de 30 minutos, la suspensión se filtra y se seca. Se recolectan 44 partes de un compuesto, el cual en la forma del ácido libre corresponde a la fórmula

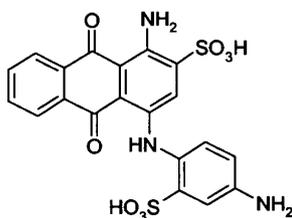


(λ_{\max} : 586 nm)

(103).

Ejemplo 4:

- a) Se dispersan 19.36 partes de cloruro cianúrico en 50 partes de agua y 60 partes de hielo. Se disuelven de forma neutra 48.95 partes de un compuesto el cual en la forma del ácido libre corresponde a la fórmula

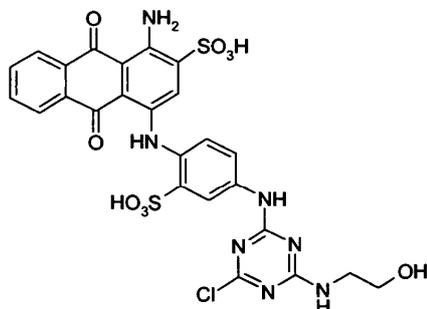


con hidróxido de sodio en 500 partes de agua. La solución neutra, así obtenida, se agrega a la dispersión anterior de cloruro cianúrico durante 45 minutos a la vez que se mantiene el valor de pH en 5 por adición gota a gota de una solución acuosa de hidróxido de sodio (30%). La mezcla de reacción se mantiene a pH 5 y la temperatura se mantiene a 0° C durante un par de horas.

- b) Se agregan 6.72 partes de etanolamina a la solución obtenida de acuerdo con la etapa (a). El valor de pH se eleva a 8.5 inmediatamente por adición de una solución acuosa de soda (20%) y la temperatura se incrementa a 40° C. Estas condiciones se mantienen durante un par de horas.

- c) Se agregan 150 partes de cloruro de sodio a 2000 partes de la mezcla de reacción. Después de 30 minutos la suspensión se filtra y se seca. Se recolectan 88 partes de un compuesto, el cual en la forma del ácido libre corresponde a la fórmula

5



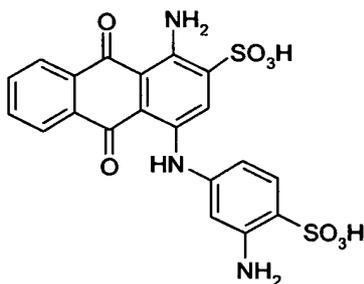
(104).

10

 $(\lambda_{\max}: 622 \text{ nm})$ **Ejemplo 5:**

- a) Se dispersan 7.75 partes de cloruro cianúrico en 30 partes de agua y 40 partes de hielo. Se disuelven en forma neutra 19.58 partes de un compuesto el cual en la forma del ácido libre corresponde a la fórmula

15



20

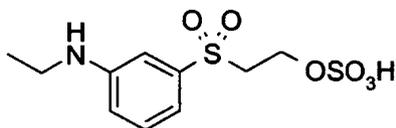
25

con hidróxido de sodio en 200 partes de agua. La solución neutra, así obtenida, se agrega a la dispersión anterior de cloruro cianúrico durante 45 minutos a la vez que se mantiene el valor de pH en 5 por adición gota a gota de una solución acuosa de hidróxido de sodio (30%). La mezcla de reacción se mantiene a pH 5 y la temperatura se mantiene a 0° C durante un par de horas.

30

- b) Se disuelven previamente 13.61 partes de un compuesto, el cual en la forma del ácido libre corresponde a la fórmula

35

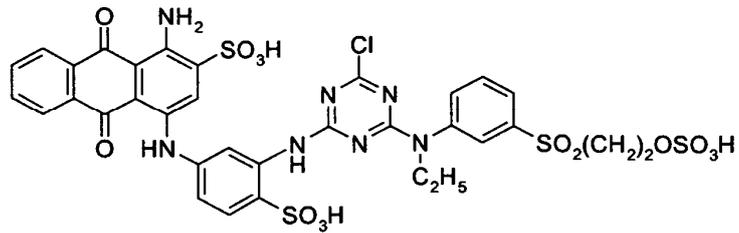


40

con una solución acuosa de soda (20%) a pH 5 se agrega a la solución obtenida de acuerdo con la etapa (a). El valor de pH se eleva a 7 inmediatamente por adición de una solución acuosa de soda (20%) y la temperatura se deja incrementar hasta 20° C. Estas condiciones se mantienen durante la noche. Se seca el producto.

45

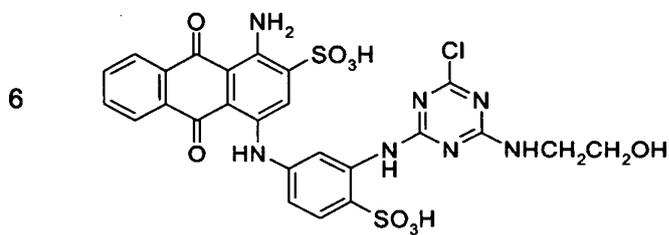
- c) Se forma una pasta con 98.6 partes del producto seco obtenido con (b) con 35 partes de una solución de cloruro de sodio (5%). Subsecuentemente, se agregan 2 porciones de 17.5 partes de cloruro de sodio y dos porciones de 100 partes de acetona. La suspensión se agita durante 30 minutos se filtra y seca. Se recolectan 76.56 partes de un compuesto, el cual en la forma del ácido libre corresponde a la fórmula



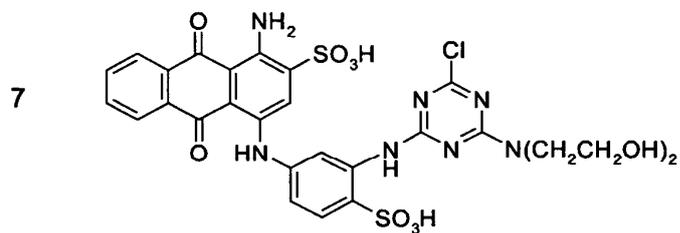
(105).

Ejemplos 6 a 25:

De una forma análoga a la descrita en los ejemplos 1 a 5 es posible obtener los colorantes-ligandos de las fórmulas



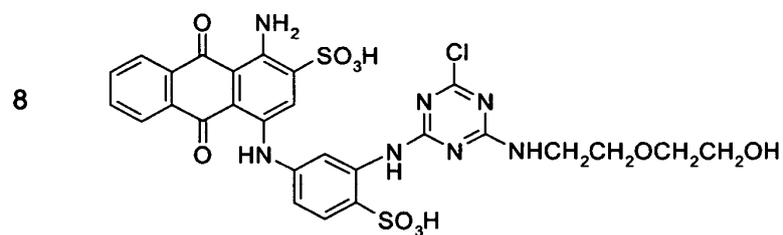
(106),

 $(\lambda_{\max}: 600 \text{ nm})$ 

(107),

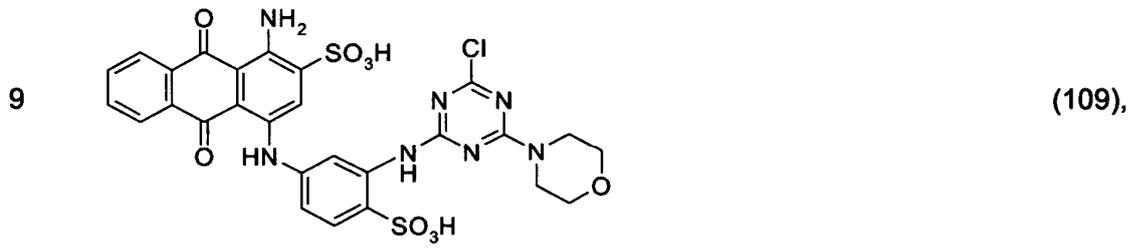
 $(\lambda_{\max}: 598 \text{ nm})$

5



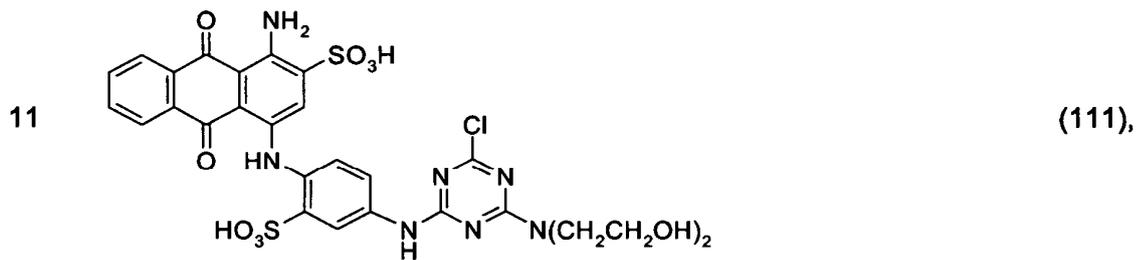
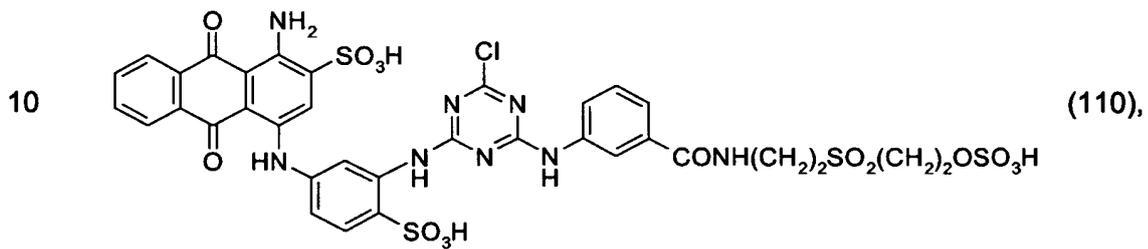
(108),

 $(\lambda_{\max}: 600 \text{ nm})$

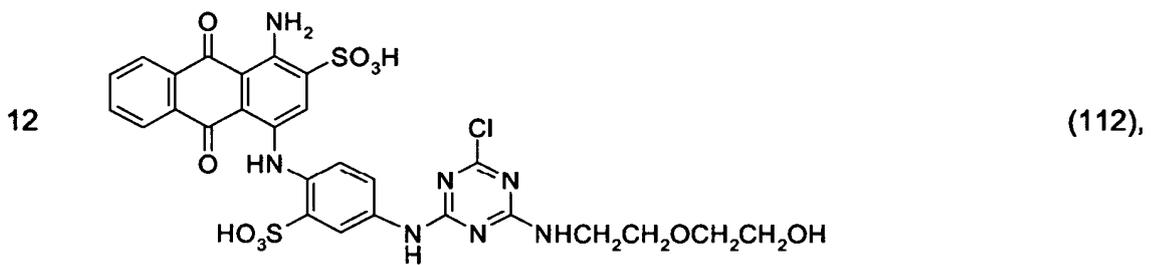


5

(λ_{\max} : 600 nm)

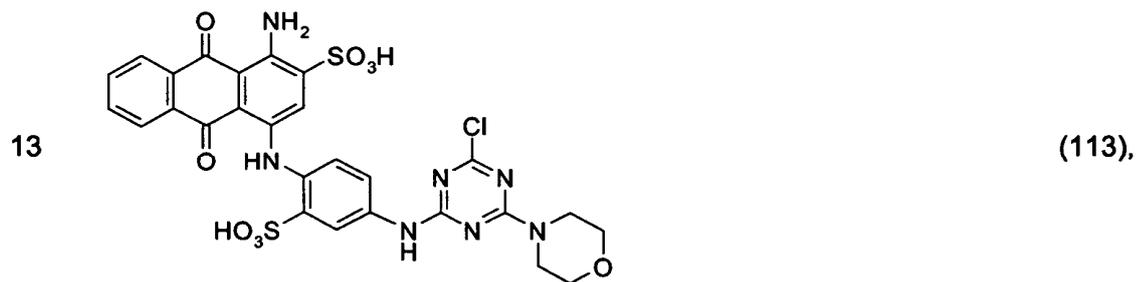


(λ_{\max} : 620 nm)

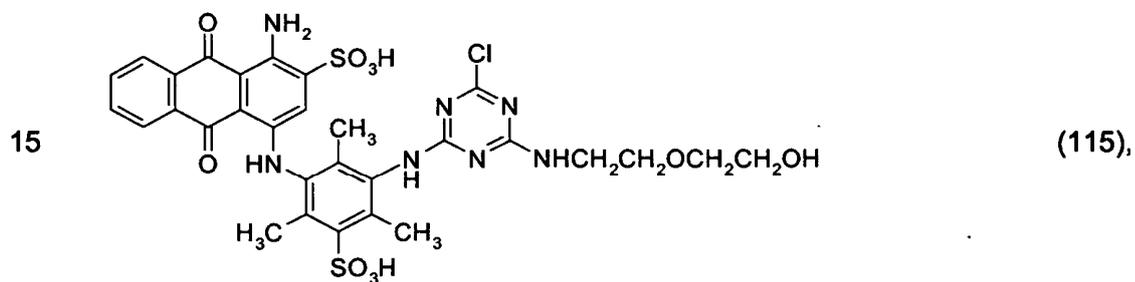
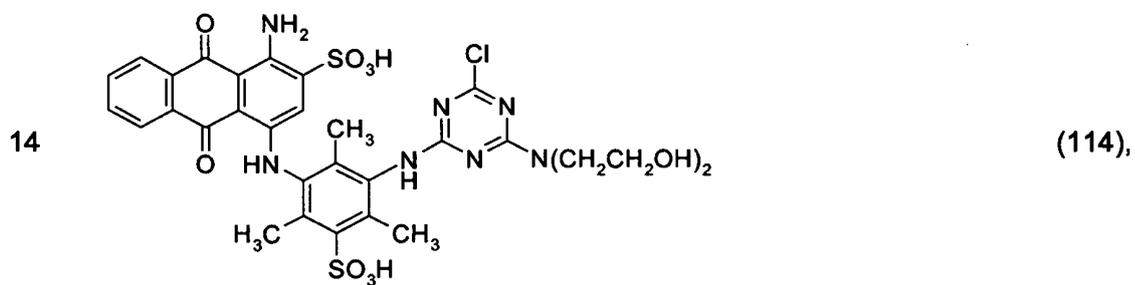


(λ_{\max} : 620 nm)

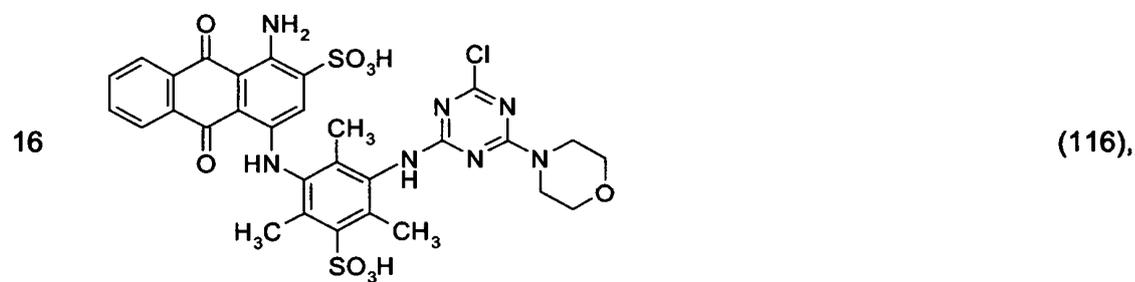
10



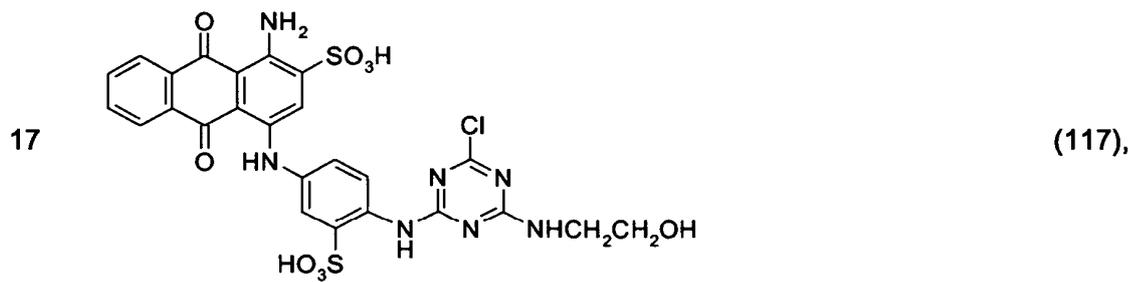
(λ_{\max} : 624 nm)



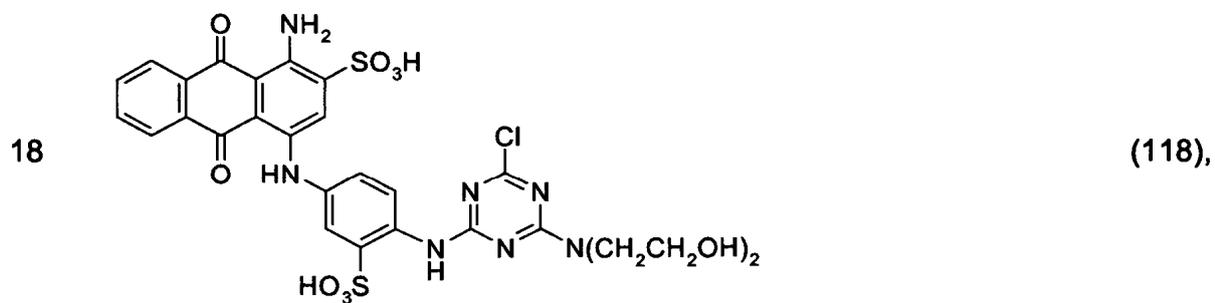
(λ_{\max} : 586 nm)



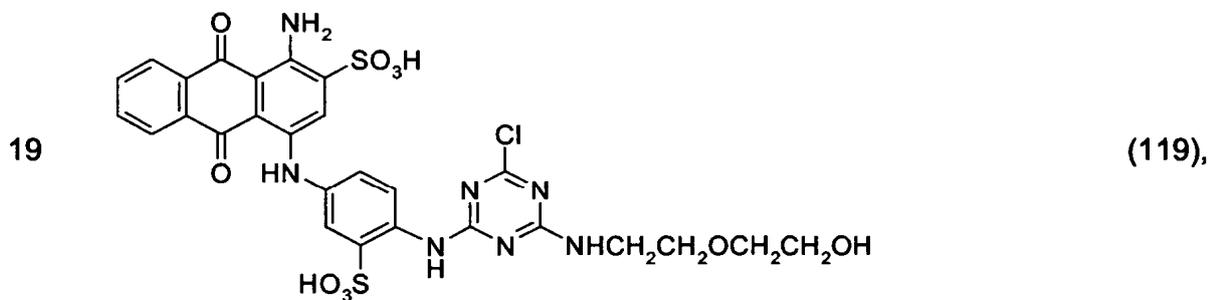
(λ_{\max} : 588 nm)



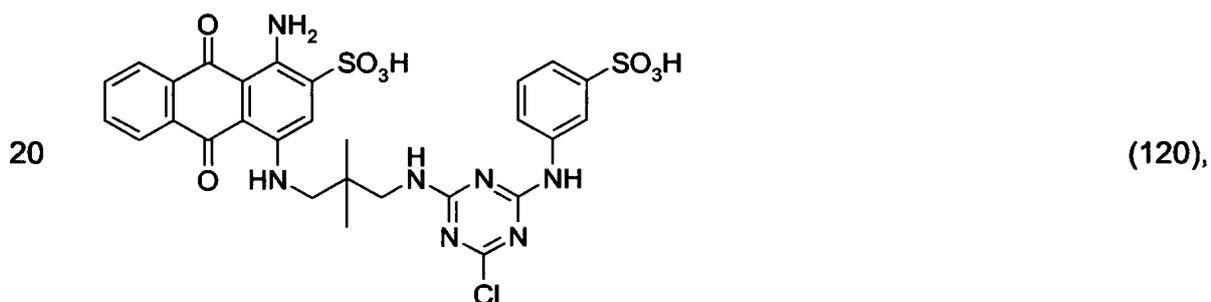
(λ_{\max} : 622 nm)

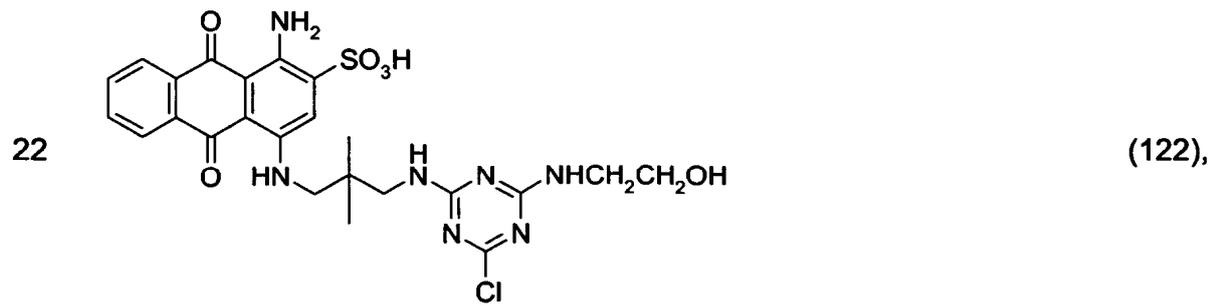
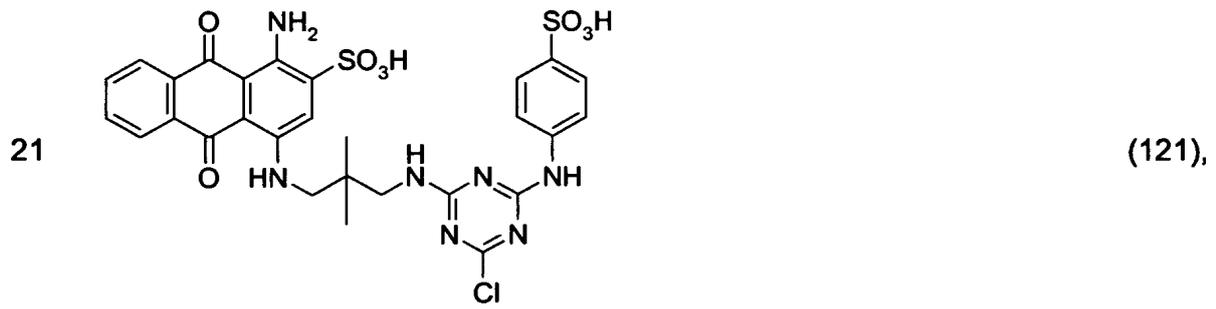


(λ_{\max} : 624 nm)

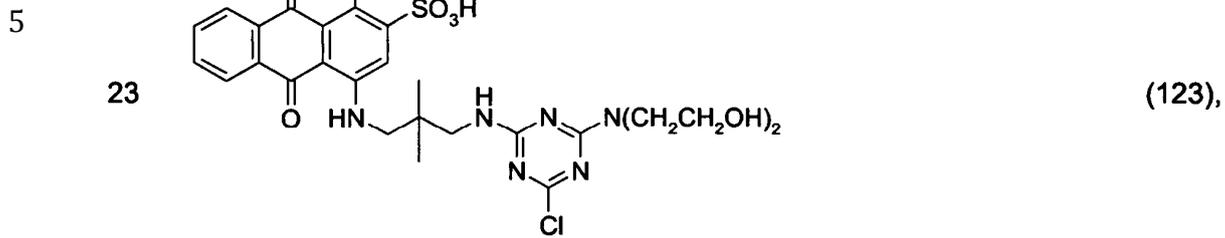


(λ_{\max} : 622 nm)

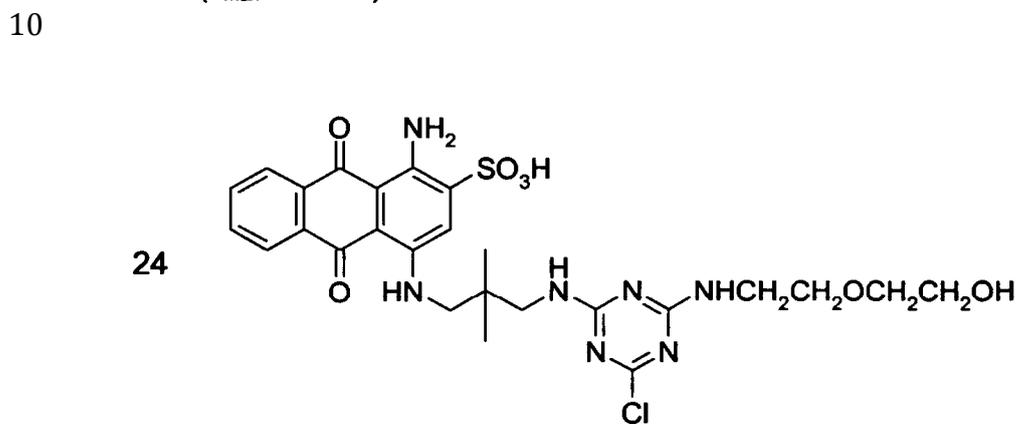




(λ_{\max} : 642 nm)

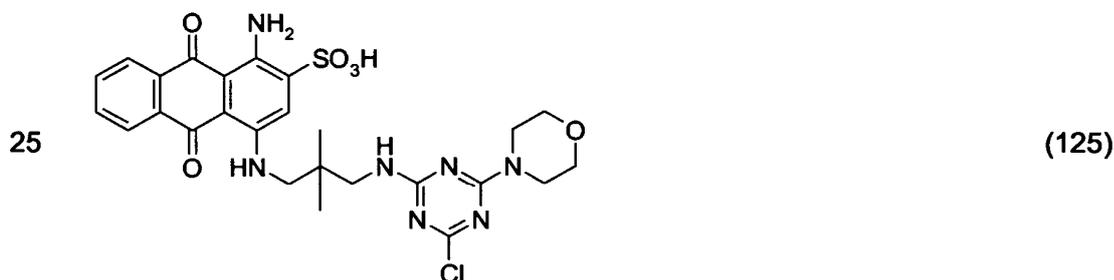


(λ_{\max} : 644 nm)



(λ_{\max} : 644 nm)

y



(λ_{\max} : 646 nm)

Preparación de los Adsorbentes

Ejemplos 26 (protocolo general para la síntesis de adsorbentes a través de inmovilización directa):

- 5 Se lava gel de agarosa (6% entrecruzada [CL], 3 g) con agua (70 ml) y se agregan a una solución del colorante-ligando (30-60 μmol) en agua (3-9 ml). La mezcla se agita durante 5 minutos y se agregan 220 g/l de solución de cloruro de sodio (0.6 ml) después de 30 minutos adicionales de agitación, se agrega lentamente carbonato de sodio 1.5 g a la suspensión anterior y se agita suavemente a 180 rpm a 60° C durante 2-16 h. La mezcla se deja enfriar, se filtra y el sólido se lava sucesivamente con agua (300 ml), cloruro de sodio acuoso 1 M (150 ml), DMSO-agua 1:1 p/p (30ml), cloruro de sodio acuosa 1 M (150 ml), soluciones reguladoras (90 ml) cada una de pH 3, pH 9 y agua (300 ml). El Adsorbente drenado se almacena en metanol al 20% v/v a 4 °C.
- 10

Las densidades del colorante ligando se calculan utilizando análisis diferencial (colorante sin reaccionar en el filtrado) o análisis por gel de acuerdo con el procedimiento siguiente.

- 15 El adsorbente (0.1 g, peso húmedo según filtra) se digiere durante una hora a 40° C en HCl 6M (25 ml) y las densidades del ligando de los adsorbentes se estiman a partir de la absorbancia (a λ_{\max}) del digerido de HCl por medio de soluciones estándar con una cantidad conocida del colorante-ligando.

En algunos casos se utiliza NaOH como base en vez de carbonato de sodio y también se altera el tiempo.

Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Inmovilización directa

Muestra	Agarosa	Colorante de Fórmula	Base	Tiempo de Tratamiento	Densidad Colorante-Ligando [$\mu\text{mol/g}$]
BS -101	6% C L	-105	Na ₂ CO ₃	2 h	7.9
BS -102	4 % CL	-105	Na ₂ CO ₃	2 h	8.9
BS -103	6 % CL	-108	Na ₂ CO ₃	2 h	4.3
BS -104	6 % CL	-201	Na ₂ CO ₃	2 h	8.0
BS -105	4 % CL	-201	Na ₂ CO ₃	2 h	12.7
BS -106	6 % CL	-110	Na ₂ CO ₃	2 h	5.3

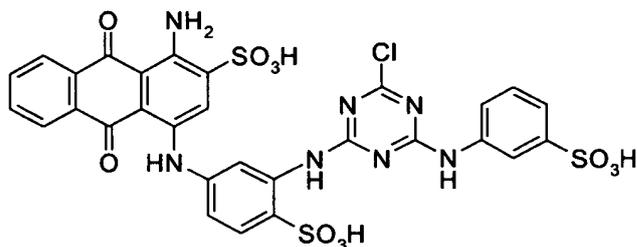
20

(continuación)

Muestra	Agarosa	Colorante de Fórmula	Base	Tiempo de Tratamiento	Densidad Colorante-Ligando [$\mu\text{mol/g}$]
BS -107	6 % CL	(109)	Na ₂ CO ₃	2 h	7.6
BS -201	6 % CL	(104)	Na ₂ CO ₃	4 h	2.4
BS -301	6 % CL	(103)	Na ₂ CO ₃	16 h	8.1
BS -302	6 % CL	(115)	Na ₂ CO ₃	2 h	6.0
BS -109	6 % CL	(106)	NaOH	4 h	8.9
BS -305	6 % CL	(114)	NaOH	4 h	1.7
BS -306	6 % CL	(116)	NaOH	16 h	5.5
BS -401	6 % CL	(117)	Na ₂ CO ₃	2 h	5.7
BS -402	6 % CL	(119)	Na ₂ CO ₃	2 h	7.5
BS -404	6 % CL	(120)	Na ₂ CO ₃	16 h	5.0
BS -204	6%CL	(112)	Na ₂ CO ₃	4 h	6.2
BS -203	6 % CL	(111)	Na ₂ CO ₃	4 h	6.2
BS -205	6 % CL	(113)	Na ₂ CO ₃	16 h	6.8
BS -113	6 % CL	(107)	Na ₂ CO ₃	2 h	4.5
BS -501	6 % CL	(101)	Na ₂ CO ₃	4 h	6.0
BS -502	6 % CL	(125)	NaOH	4 h	7.1
BS -503	6 % CL	(121)	Na ₂ CO ₃	4 h	4.9
BS -504	6 % CL	(122)	Na ₂ CO ₃	4 h	3.7
BS -408	6 % CL	(118)	Na ₂ CO ₃	16 h	6.2

Ejemplo 27 (protocolo para la síntesis de una adsorbente a través de inmovilización directa):

- 5 Se lava gel de agarosa (6% entrecruzado, 3 g) con agua (70 ml) y se agrega a una solución de un colorante-ligando de fórmula



(201)

5 (0.465 g, 60 μmol) en agua (3 ml) la mezcla se agita durante 5 minutos y se agregan 220 g/l de solución de cloruro de sodio (0.6 ml) después de 30 minutos adicionales de agitación, se agrega lentamente carbonato de sodio (1.5) a la suspensión anterior y se agita suavemente a 180 rpm a 60° C durante 2 horas. La mezcla se deja enfriar, se filtra y el sólido se lava sucesivamente con agua (30 ml), cloruro de sodio acuoso 1M (150 ml), DMSO-agua 1:1 v/v (30 ml), cloruro de sodio 1M (150 ml), soluciones reguladoras (90 ml) cada una pH 3, pH 9 y agua (300 ml). El adsorbente drenado se almacena en metanol al 20% v/v a 4 °C.

10 El adsorbente (0.1 g, peso húmedo según se filtra) se digiere durante una hora a 40° C en HCl 6M (25 ml) y la densidad del ligando del adsorbente se estima a partir de la absorbancia ($a_{\lambda_{\text{max}}}$) del digerido de HCl como 8.0 $\mu\text{mol/g}$ de gel de drenado.

El Ejemplo 27 es para propósitos de ilustración. El colorante-ligando de la fórmula (201) está excluido del alcance de la fórmula genérica (1) de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 28 (protocolo general para la síntesis de adsorbentes a través de espaciadores):

15 Se lava gel de agarosa (6% entrecruzado, 14 g) con agua (300 ml) y se suspende inmediatamente en agua (56 ml) en un RB adecuado o un matraz cónico. Se agrega epiclorhidrina (6.72 a 25.2 mmol) seguida por una cantidad equivalente de NaOH (6.72 a 25.2 mmol) y la masa de reacción se agita a 150 rpm durante 3 horas a 27 °C. Entonces se filtra la suspensión, se lava exhaustivamente con agua (850 ml) y se drena para obtener agarosa activada con epoxi.

20 La agarosa activada con epoxi (13 g) se agrega a una solución de 1,6-diaminoalcan (6.24 a 9.36 mmol) en agua (52 ml). La mezcla de reacción se agita durante 4 horas a 27° C o 45° C y se filtra. El gel funcionalizado con amino resultante se lava exhaustivamente con agua (750 ml) y se drena.

La agarosa funcionalizada con amino (4 g) se suspende en una solución de colorante-ligando (80 μmol) en agua (16 ml) y la mezcla se agita a 150 rpm durante 16 horas a 27 °C. La suspensión se filtra y se lava el exceso de colorante-ligando con agua (250 ml), NaCl 1M (100 a 200 ml), DMSO-agua 1:1 v/v (60 a 80 ml), NaCl 1M (100 a 200 ml) y finalmente agua (250 ml). El adsorbente drenado se almacena en metanol al 20% v/v a 4°C.

25 Las densidades de los colorantes-ligando se calcularon utilizando análisis diferencial (colorantes sin reaccionar en el filtrado) o análisis por gel de acuerdo con el siguiente procedimiento.

El adsorbente (0.1 g, peso húmedo según se filtra) se digiere durante 1 hora a 40°C en HCl 6M (25 ml) y las densidades del ligando del adsorbente se estiman a partir de la absorbancia ($a_{\lambda_{\text{max}}}$) del digerido en HCl por medio de soluciones estándar con una cantidad conocida del colorante-ligando.

30 Los resultados se presentan en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2: Inmovilización indirecta a través de espaciadores

Muestra	Colorante de Fórmula	Epiclorhidrina [$\mu\text{mol/g}$]	Diaminohexano [$\mu\text{mol/g}$]	Densidad/Colorante-Ligando [$\mu\text{mol/g}$]
BS-111	-201	480	480	2.6
BS-112	-110	480	480	7.7
BS-114	-106	480	480	3.0
BS-115	-107	480	480	2.4
BS-116	-108	480	480	4.1
BS-118	-109	480	480	6.7
BS-308	-114	480	480	3.9
BS-309	-115	480	480	4.7
BS-310	-116	480	480	3.6
BS-409	-117	480	480	4.5
BS-410	-118	480	480	4.3
BS-411	-119	480	480	4.3
BS-412	-120	480	480	4.5
BS-505	-101	480	480	3.6
BS-506	-121	480	480	3.9
BS-507	-122	480	480	2.9
BS-211	-104	720	720	4.5
BS-212	-111	720	720	3.4
BS-213	-112	720	720	5.1
BS-214	-113	720	720	5.1
BS-314	-103	720	720	10.0
BS-508	-125	720	720	5.5
BS-124	-105	1800	480	15.3
BS-125	-106	1800	480	16.2
BS-126	-107	1800	480	13.3
BS-219	-104	1800	480	8.6

(continuación)

Muestra	Colorante de Fórmula	Epiclorhidrina [□mol/g]	Diaminohexano [□mol/g]	Densidad/Colorante-Ligando [□mol/g]
BS-220	-111	1800	480	7.1
BS-221	-112	1800	480	8.8
Agarosa entrecruzada (CL) al 6% utilizada como soporte para todos los adsorbentes				

Tabla 3: Inmovilización indirecta a través de espaciadores

5

Muestra	Colorante de Fórmula	Diaminoalcano	Densidad/ Colorante-Ligando [μmol/g]
BS-151	(106)	Diaminoetano	4.4
BS-152	(107)	Diaminoetano	3.7
BS-153	(109)	Diaminoetano	5.2
BS-335	(116)	Diaminoetano	5.1
BS-433	(118)	Diaminoetano	3.4
BS-434	(120)	Diaminoetano	1.7
BS-522	(122)	Diaminoetano	2.9
BS-245	(111)	Diaminoetano	1.7
BS-246	(112)	Diaminoetano	2.7
BS-334	(103)	Diaminoetano	6.3
BS-521	(125)	Diaminoetano	6.1
BS-148	(106)	Diaminobutano	7.7
BS-149	(107)	Diaminobutano	6.5
BS-150	(109)	Diaminobutano	9.6
BS-333	(116)	Diaminobutano	9.5
BS-431	(118)	Diaminobutano	8.4
BS-432	(120)	Diaminobutano	10.0
BS-520	(122)	Diaminobutano	6.5

(continuación)

5

10

15

BS-242	(111)	Diaminobutano	2.8
BS-243	(112)	Diaminobutano	4.4
BS-332	(103)	Diaminobutano	10.3
BS-519	(125)	Diaminobutano	4.5
BS-145	(106)	Diaminooctano	11.3
BS-146	(107)	Diaminooctano	10.1
BS-147	(109)	Diaminooctano	14.8
BS-331	(116)	Diaminooctano	14.3
BS-429	(118)	Diaminooctano	12.5
BS-430	(120)	Diaminooctano	16.0
BS-518	(122)	Diaminooctano	11.6
BS-239	(111)	Diaminooctano	5.5
BS-240	(112)	Diaminooctano	8.4
BS-330	(103)	Diaminooctano	12.5
BS-517	(125)	Diaminooctano	11.6

20 Ejemplo 29 (protocolo para la síntesis de un adsorbente a través de espaciadores):

Se lava gel de agarosa (6% entrecruzado, 14 g) con agua (300 ml) y se suspende inmediatamente en agua (56 ml) en un matraz RB de 100 ml. Se agrega epiclorhidrina (0.6216 g, 6.72 mmol) seguida por NaOH (0.268 g, 6.72 mmol) y la mezcla de reacción se agita a 150 rpm durante 3 horas a 27 °C. Luego se filtra la suspensión, se lava exhaustivamente con agua (850 ml) y se drena para obtener agarosa activada con epoxi.

25 La agarosa activada con epoxi (13 g) se agrega a una solución de 1,6-diaminohexano (0.7612 g, 6.56 mmol) en agua (52 ml). La mezcla de reacción se agita durante 4 horas a 27 °C y se filtra. El gel resultante funcionalizado con amino se lava exhaustivamente con agua (750 ml) y se drena.

30 La agarosa funcionalizada con amino (4 g) se suspende en una solución de colorante-ligando de fórmula (106) (0.0537 g, 81.1 μmol) en agua (16 ml) y la mezcla de reacción se agita a 150 rpm durante 16 horas a 27 °C. La mezcla de reacción se filtra y el exceso de colorante-ligando se lava con agua (250 ml), NaCl 1M (100 ml), DMSO-agua 1:1 v/v (60 ml), NaCl 1M (100 ml) y finalmente agua (250 ml). El adsorbente drenado se almacena en metanol al 20% v/v a 4 °C.

El adsorbente (0.1 g, peso húmedo según se filtra) se digiere durante 1 hora a 40°C en HCl 6M (25 ml) y la densidad del ligando del adsorbente se estiman a partir de la absorbancia (a λ_{max}) del digerido en HCl como 3.0 $\mu\text{mol/g}$ de gel drenado.

35 Purificación de Materiales Biológicos:

La prueba de los adsorbentes para determinar su efectividad en la purificación de proteínas se hace principalmente con

dos clases de enzimas. Las clases de enzimas representativas oxidoreductasa e hidrolasa se utilizan para evaluar la eficacia de los adsorbentes. Estos ejemplos de proteínas incluyeron lacasa-NADP-glutamato deshidrogenasa (NADP-GDH) (S.Noor y N.S.Punekar, Microbiology, 2005, 151, 1409), arginasa y tripsina. Excepto para la tripsina todas las otras enzimas son de origen fúngico.

- 5 La selección de todos los adsorbentes se lleva a cabo en un modo de enlazamiento por lote y elución. Los adsorbentes con diversidad estructural son selectivos y claramente discriminan entre las diferentes proteínas probadas. Por ejemplo, bajo un conjunto de condiciones de equilibrio, la NADP-GDH se enlaza selectivamente a BS-212 y BS-213. Uno de estos puede utilizarse en una purificación en escalas. Esta NADP-GDH sin embargo no se enlaza con el colorante de triazina Azul Cibracon 3GA usado extensamente (S.Subramanian, CRC Critical Rev. Biochem., 1984, 16, 169).

10 Tabla 4: Inmovilización directa: Resultados de prueba para adsorbentes seleccionados

Muestra	Actividad Enzimática Enlazada/Eluida (del % cargado)	
	Lacasa	NADP-GDH
BS-101	33	27
BS-103	42	7
BS-104	0	11
BS-106	42	5
BS-107	17	29
BS-113	9	21
BS-201	18	6
BS-203	9	0
BS-204	18	0
BS-205	0	26
BS-301	8	8
BS-302	24	6
BS-305	31	0
BS-306	0	4
BS-401	16	0
BS-402	24	0
BS-403	16	11
BS-404	31	0
BS-408	42	0

(continuación)

Muestra	Actividad Enzimática Enlazada/Eluida (del % cargado)	
	Lacasa	NADP-GDH
BS-501	37	9
BS-502	0	0
BS-503	23	6
BS-504	44	0

Tabla 5: Inmovilización indirecta (espaciador ECH-DAH): Resultados de prueba para adsorbentes seleccionados:

Muestra	Actividad Enzimática Enlazada/Eluida (del % cargado)	
	Lacasa	NADP-GDH
BS-111	50	21
BS-112	25	20
BS-114	59	23
BS-115	75	17
BS-116	76	19
BS-118	85	5
BS-211	82	70
BS-212	90	77
BS-213	96	57
BS-214	96	59
BS-308	78	10
BS-309	80	7
BS-310	83	7
BS-314	92	14
BS-409	69	12

(continuación)

Muestra	Actividad Enzimática Enlazada/Eluida (del % cargado)	
	Lacasa	NADP-GDH
BS-410	81	14
BS-411	83	0
BS-412	69	25
BS-505	82	0
BS-506	83	0
BS-507	85	0
BS-508	78	57

Tabla 6: Inmovilización directa (espaciadores ECH- DAE, ECH-DAB, ECH-DAO): Resultados de prueba:

Muestra	Actividad Enzimática Enlazada/Eluida (del % cargado)	
	Lacasa	Arginasa
BS-151	34	47
BS-152	36	46
BS-153	21	37
BS-335	30	64
BS-433	30	72
BS-434	25	71
BS-522	36	55
BS-245	23	44
BS-246	13	72
BS-334	23	65
BS-521	36	42
BS-148	74	40
BS-149	83	42

(continuación)

Muestra	Actividad Enzimática Enlazada/Eluida (del % cargado)	
	Lacasa	Arginasa
BS-150	71	38
BS-333	41	55
BS-431	39	64
BS-432	42	67
BS-520	57	51
BS-242	56	54
BS-243	42	62
BS-332	48	56
BS-519	51	44
BS-145	77	35
BS-146	94	43
BS-147	69	32
BS-331	42	56
BS-429	53	63
BS-430	45	69
BS-518	54	50
BS-239	60	48
BS-240	64	64
BS-330	40	55
BS-517	52	39

Ejemplo 30

5 Procedimiento General (*Aspergillus terreus* NADP-glutamato deshidrogenasa):

10 El hongo se cultiva sobre un medio mínimo (con nitrato como fuente de nitrógeno) hasta una fase logarítmica media y las micelios se recolectan por filtración. El extracto crudo de NADP-GDH de estas células se prepara en un regulador de extracción (fosfato 100 mM, PMSF 1mM, EDTA 1mM, 2-mercaptoetanol 4 mM) a pH 7.4. La fracción de sulfato de amonio de 30-70% se desaliniza sobre una matriz G-25 y se utiliza para las pruebas. La actividad se monitoriza mediante la oxidación continua de NADPH a 340 nm. Una unidad de actividad (U se define como una μmol de NADPH oxidada por minuto en una prueba estándar de un ml. En todos los estudios de enlazamiento se aplican

aproximadamente 100 mU de NADP-GDH de muestra a las resinas de afinidad.

- 5 Modo por lote en tubo de microcentrifugas: el adsorbente (0.3 ml, volumen empacado) se equilibra con un regulador de cromatografía (fosfato 20 mM, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 4 mM) a pH 7.5 en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se aplica la muestra de NADP-GDH cruda (aproximadamente 100 mU en aproximadamente 100 μ l) sobre esta matriz y se incuba sobre hielo durante 15 minutos. La fracción no enlazada se recolecta como sobrenadante por centrifugación (1000 rpm durante 2 minutos). La matriz se lava dos veces con 0.5 ml del mismo regulador. Las proteínas enlazadas se eluyen dos veces (0.4 ml cada vez) por centrifugación, utilizando primero KCL a 0.3M y luego KCL a 0.5 M, en el mismo regulador. Todas las incubaciones se llevan a cabo con un tiempo de incubación de 10 minutos y todas las operaciones en una microcentrifuga de enfriamiento.
- 10 Los adsorbentes muestran distintos patrones de enlazamiento/elución con respecto a las actividades enzimáticas probadas. Proveen un rango de afinidad que es capaz de discriminar diferentes proteínas mediante diferentes enlazamientos.

Ejemplo 31:

Procedimiento General (*Aspergillus niger* Lacasa):

- 15 La proteína lacasa cruda se aísla a partir de micelios conidantes de *A.niger* en regulador de fosfato 20 mM. La fracción de sulfato de amonio 30-80% se somete a desalinización sobre una matriz G-25 y se utiliza para las pruebas. La actividad se monitoriza mediante la oxidación continua de ABTS a 436 nm. Una unidad de actividad (U) se define como una μ mol de ABTS oxidado por minuto en una prueba estándar de un ml. En todos los estudios de enlazamiento se aplica aproximadamente 5 mU de muestra de la casa sobre las resinas de afinidad.
- 20 a) Modo de columna de microrrotación: la resina de afinidad (0.25 ml, volumen empacado) se equilibra con regulador de fosfato de 20 mM (pH 7.0) en una microcolumna de rotación. La muestra de lacasa cruda (aproximadamente 5 mU en aproximadamente 100 μ l) se aplica sobre esta matriz y se incuba sobre hielo durante 15 minutos. La fracción no enlazada se recolecta por centrifugación (1000 rpm durante 2 minutos). La matriz se lava adicionalmente con 0.3 ml de regulador de fosfato. Las proteínas enlazadas se eluyen dos veces (0.3 ml cada vez) por centrifugación, utilizando KCL 0.6 M en el mismo regulador.
- 25 b) Modo de lote en tubo de microcentrifuga: el adsorbente (0.3 ml, volumen empacado) se equilibra con regulador de fosfato 20 mM (pH 7.0) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. La muestra de lacasa cruda (aproximadamente 5 mU en aproximadamente 100 μ l) se aplica sobre esta matriz y se incuba sobre hielo durante 15 minutos. La fracción no enlazada se recolecta como sobrenadante por centrifugación (1000 rpm durante 2 minutos). La matriz se lava con 0.5 ml de regulador de fosfato. Las proteínas enlazadas se eluyen dos veces (0.4 ml cada vez) por centrifugación, usando KCL 0.6 M en el mismo regulador. Todas las incubaciones se llevan a cabo con un tiempo de incubación de 10 minutos y todas las operaciones en una microcentrifuga con enfriamiento.
- 30

Ejemplo 32

- 35 Procedimiento General (*Aspergillus niger* Arginasa):

El hongo se cultiva sobre un medio mínimo (con arginina como única fuente de nitrógeno) hasta una fase logarítmica media y los micelios se recolectan por filtración. El extracto de arginasa crudo a partir de estas células se prepara en un regulador de extracción (imidazol HCl 200 mM, PMSF 1mM, MnSO₄ 12 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM) a pH 7.5. La enzima se enriquece sobre una columna DEAE y las fracciones activas son reunidas, se llevan a sulfato de amonio al 70% para precipitar la actividad enzimática. Esta pella se disuelve en un regulador (Hepes-NaOH 25 mM, MnSO₄ 1.2 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, glicerol al 20%) a pH 7.5. La muestra se diluye en regulador (imidazol HCl 25 mM, MnSO₄ 1.2 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM) a pH 7.5 y se utiliza para las pruebas. La actividad se monitoriza mediante el método Archibald para estimación de la urea (a 478 nm) una unidad de actividad (U) se define como una μ mol de urea formada por minuto en una prueba estándar. En todos los estudios de enlazamiento se aplican aproximadamente 300 mU de la muestra de arginasa sobre las resinas de afinidad.

40

45

50 Modo en lote en tubo de microcentrifuga: el adsorbente (0.3 ml, volumen empacado) se equilibra con una regulador de cromatografía (imidazol HCl 25 mM, MnSO₄ 1.2 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM) a pH 7.5, en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se aplica la muestra de arginasa cruda (aproximadamente 300 mU en aproximadamente 100 μ l) a esta matriz y se incuba sobre hielo durante 15 minutos. La fracción no enlazada se recolecta como sobrenadante por centrifugación (1000 rpm durante 2 minutos). La matriz se lava dos veces con 0.5 ml del mismo regulador. Las proteínas enlazadas se eluyen dos veces (0.4 ml cada vez) por centrifugación, utilizando KCL 0.5 M en el mismo regulador. Todas las incubaciones se llevan a cabo con un tiempo de incubación de 10 minutos y todas las operaciones en una microcentrifuga de enfriamiento.

Ejemplo 33:

Purificación de NADP-GDH (*A. terreus*) utilizando adsorbente BS-212:

- 5 El hongo cultivado sobre un medio mínimo (con nitrato como fuente de nitrógeno) hasta la fase logarítmica media y los micelios se recolectan por filtración. El extracto crudo de NADP-GDH de estas células se prepara en un regulador de extracción A (fosfato 100 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 4 mM) a pH 7.5. La fracción de sulfato de amonio al 30-70% se desaliniza sobre matriz G-25 (volumen de lecho de 20 ml) equilibrado con un regulador de fosfato 20 mM (pH 7.5) que tiene EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 4 mM (regulador B). Esta proteína desalinizada se carga sobre una columna de 20 ml de BS-212 a una rata de flujo de 10 ml/hora. La columna se lava con 100 ml de regulador B a una rata de flujo de 12 ml/hora.
- 10 Las proteínas enlazadas se eluyen utilizando un gradiente lineal de KCL 0-0.3 M (20 ml + 20 ml) en regulador B. Para la elución, se mantiene una rata de flujo de 18 ml/hora y se recolectan fracciones (de 1.5 ml cada hora). Se mide la actividad de NADP-GDH siguiendo el cambio en absorbancia a 340 nm como se mencionó anteriormente. La prueba de aminación reductiva llevada a cabo en un volumen de reacción de 1.0 ml contenía tris-HCl 100 mM a pH 8.0, NH₄Cl 10 mM, 2-oxoglutarato 10 mM y NADPH 0.1 mM.
- 15 Resultados: de las 10 unidades de actividad de NADP-GDH cargadas ninguna fue recuperada en las fracciones no enlazadas o del lavado. La mayor parte de la actividad se enlazó y pudo ser eluida (9.5 unidades) utilizando el gradiente de KCL mencionado anteriormente. El perfil de esta elución se muestra en la Figura 1. La purificación alcanzada por esta etapa sencilla utilizando el adsorbente fue monitorizada por el PAGE nativo de la muestra cargada y de la fracción del pico. La Figura 2 da la imagen de este gel. Claramente el adsorbente BS-212 fue capaz de enriquecer sustancialmente la proteína NADP-GDH del *Aspergillus* (mostrada por la flecha en la Figura 2).
- 20

Descripción de las Figuras

Figura 1

Perfil de elución de NADP-GDH de *A. terreus* a partir de la columna de BS-212 utilizando gradiente de KCL.

Figura 2

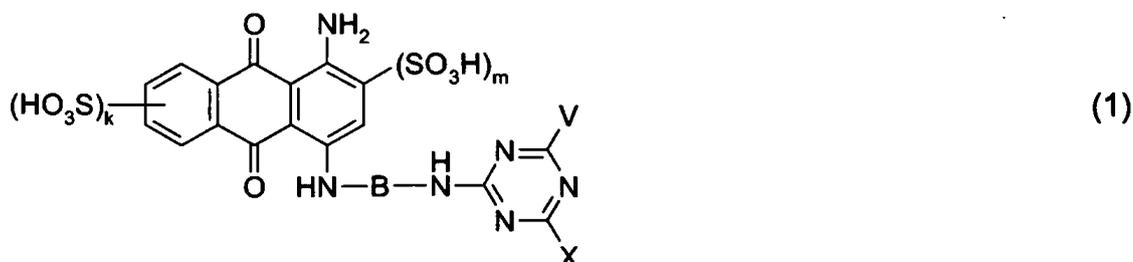
- 25 PAGE nativo (7.5%) de NADP-GDH de *A. terreus*:

Linea 1- una fracción de sulfato de amonio (30-70%) desalinizada; Linea 2- pico de la fracción de proteína (Figura 1) de la columna de BS-212 (la flecha indica la posición de la proteína de NADP-GDH).

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la separación de materiales biológicos, donde se usa un adsorbente, el cual comprende un producto de reacción y un compuesto de la fórmula

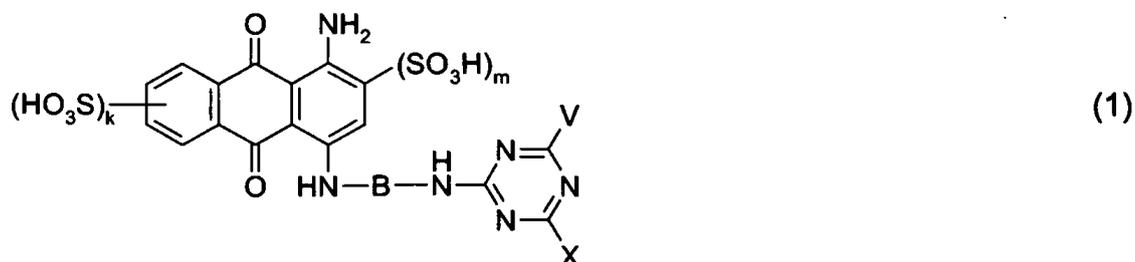
5



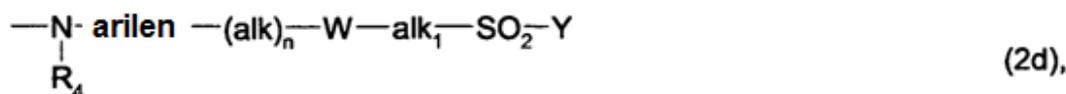
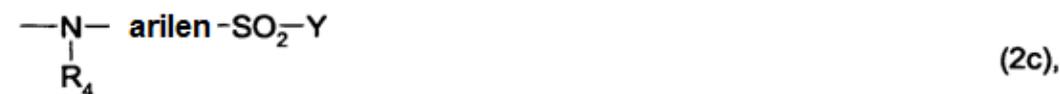
y un sustrato que tiene un grupo capaz de reaccionar con un grupo reactivo en dicho compuesto de fórmula (1) para formar un enlace covalente, en el cual B es un radical C2-C12alquileo, que puede estar interrumpido por 1, 2 o 3 miembros del grupo consistente en -NR₁- o -O- y es no sustituido o sustituido por hidroxilo, sulfo, sulfato, ciano o carboxilo, R₁ es hidrógeno o C₁-C₄alquilo, o B es un radical C5-C9cicloalquileo, radical C1-C4alquilen-C5-C9cicloalquileo o C₁-C₄alquilen-C₅ C₉cicloalquilen-C₁-C₄alquileo radical, los cuales están no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, sulfo, halógeno o carboxilo, o un radical fenileno, radical C1-C4alquilen-fenileno o radical C1-C4alquilen-fenileno-C1-C4alquileo, los cuales están no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, C₂-C₄alcanoilamino, sulfo, halógeno o carboxilo, V es un sustituyente reactivo a materiales no fibrosos o es un sustituyente reactivo a la fibra de fórmula

10

15



20



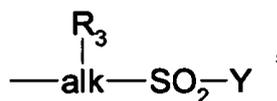


5



donde R₂ es hidrógeno o C₁-C₄ alquilo no sustituido o sustituido o un radical

10



15

R₃ es hidrógeno, hidroxilo, sulfato, sulfato, carboxi, ciano, halógeno, C₁-C₄alcoxicarbonilo, C₁-C₄-alcanoiloxi, carbamoilo o un grupo -SO₂-Y,

R₄ es hidrógeno o C₁-C₄alquilo,

alk y alk1 son independientemente uno del otro C₁-C₆ alquilenos lineales o ramificados,

20

arileno es un radical fenileno o naftileno el cual es no sustituido o sustituido por sulfato, carboxi, hidroxilo, C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi o por halógeno,

Y es vinilo o un radical -CH₂-CH₂-U y U es un grupo saliente,

Y₁ es un grupo -CH(Hal)-CH₂(Hal) o -C(Hal)=CH₂ donde Hal es cloro o bromo,

W es un grupo -SO₂-NR₄-, -CONR₄- o -NR₄CO- donde R₄ es como se definió más arriba,

Q es un radical -O- o -NR₄- donde R₄ es como se definió más arriba, y

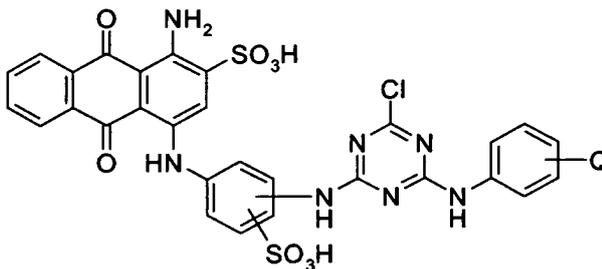
25

n es un número 0 o 1,

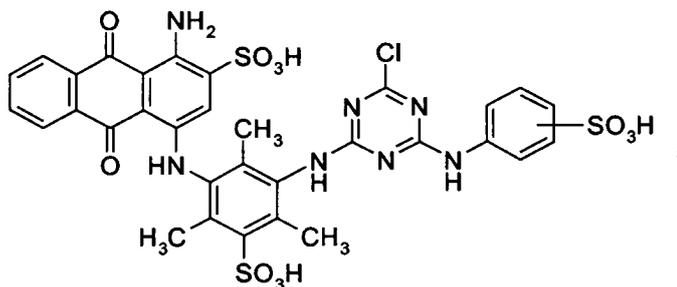
X es halógeno, y

k y m son independientemente uno del otro un número 0 o 1 y la suma de k+m es 1 o 2, con la excepción de un adsorbente, que comprende un compuesto de fórmula

30



y

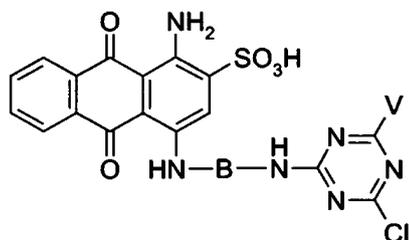


5

Donde Q es sulfo o carboxi.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de fórmula (1) corresponde a un compuesto de fórmula

10



(1a),

15

20

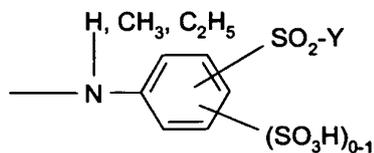
donde B es un radical C2-C6alquileo, un radical metilen-ciclohexileno, el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo, o a fenileno o metilen-fenilen-metileno radical, el cual es no sustituido o sustituido por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, halógeno o sulfo,

25

V es amino, N-mono- o N,N-di-C₁-C₄alquilamino el cual es no sustituido o sustituido en la unidad estructural alquilo por hidroxilo, sulfato o por sulfo Y es no interrumpido o interrumpido por un radical -O-, morfolino, fenilamino o N-C₁-C₄alquil-Nfenilamino el cual es no sustituido o sustituido en el anillo fenilo por sulfo, carboxi, cloro, acetilamino, metilo o por metoxi, o naftilamino el cual es no sustituido o sustituido por de 1 a 3 grupos sulfo, o

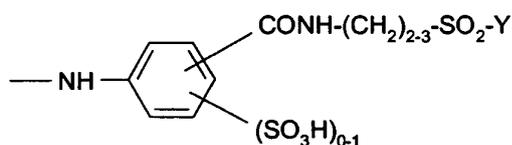
30

V es un grupo de fórmula



(2c')

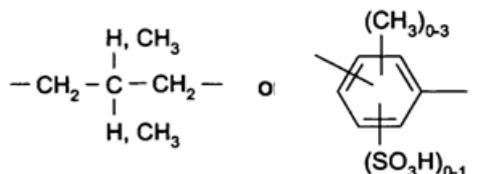
o



(2d')

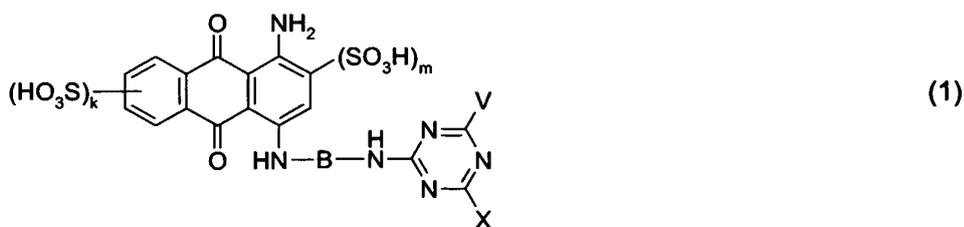
35

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, donde B es un radical



- 5 V corresponde a β -hidroxietilamino, 2-(β -hidroxietoxi)etilamino, N,N-di- β -hidroxietilamino, β -sulfoetilamino, morfolino, 2-, 3- o 4-sulfofenilamino, 1-sulfonaft-2-il-amino, o V es un grupo de fórmula (2c') o (2d') como se define en la reivindicación 2.

- 10 4. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 donde el sustrato es un carbohidrato o un carbohidrato modificado, preferiblemente agarosa, agarosa entrecruzada, dextrosa, dextranos o versiones modificadas de los mismos.
5. Adsorbentes para la separación de materiales biológicos, los cuales comprenden un producto de reacción de un compuesto de fórmula



- 15 y un sustrato que tiene un grupo capaz de reaccionar con un grupo reactivo en dicho compuesto de fórmula (1) para formar un enlace covalente, en el cual

B es Radical C2-C12alquileo, que puede estar interrumpido por 1, 2 o 3 miembros del grupo consistente en -NR₁- o

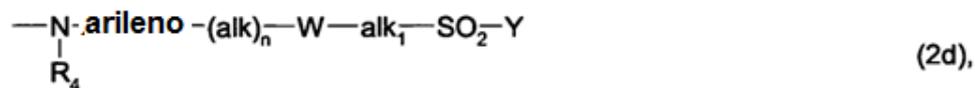
-O- y es no sustituido o sustituido por hidroxilo, sulfo, sulfato, ciano o carboxilo,

- 20 R₁ es hidrógeno o C₁-C₄alquilo, or

B es un radical C5-C9cicloalquileo, radical C1-C4alquilen-C5-C9cicloalquileo o radical C1-C4alquilen-C5-C9cicloalquilen-C1-C4alquileo, los cuales están no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, sulfo, halógeno o carboxilo, o un radical fenileno, radical C1-C4alquilen-fenileno o radical C1-C4alquilen-fenilen-C1-C4alquileo, los cuales están no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, C₂-C₄alcanoilamino, sulfo, halógeno o carboxilo,

- 25 V es un sustituyente reactivo a materiales no fibrosos o es un sustituyente reactivo a la fibra de fórmula





5 donde
 R₂ es hidrógeno o C₁-C₄ alquilo no sustituido o sustituido o un radical



R₃ es hidrógeno, hidroxilo, sulfato, sulfato, carboxi, ciano, halógeno, C₁-C₄alcoxicarbonilo, C₁-C₄-alcanoiloxi, carbamoilo o un grupo -SO₂-Y,

15 R₄ es hidrógeno o C₁-C₄alquilo, alk y alk₁ son independientemente uno del otro C₁-C₆ alquileno lineal o ramificado, arileno es un radical fenileno o naftileno el cual es no sustituido o sustituido por sulfato, carboxi, hidroxilo, C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi o por halógeno,

Y es vinilo o un radical -CH₂-CH₂-U y U es un grupo saliente,

Y₁ es un grupo -CH(Hal)-CH₂(Hal) o -C(Hal)=CH₂ donde Hal es cloro o bromo,

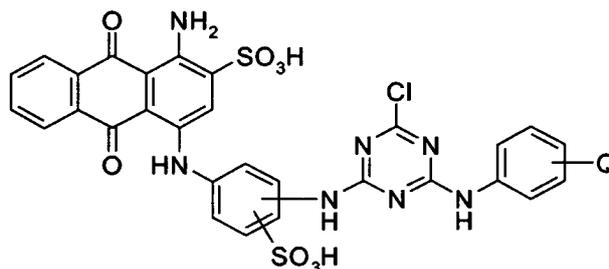
20 W es un grupo -SO₂-NR₄-, -CONR₄- o -NR₄CO- donde R₄ es como se definió más arriba,

Q es un radical -O- o -NR₄- donde R₄ es como se definió más arriba, y

n es un número 0 o 1,

X es halógeno, y

25 k y m son independientemente uno del otro un número 0 o 1 y la suma de k+m es 1 o 2, con la excepción de un adsorbente, que comprende un compuesto de fórmula

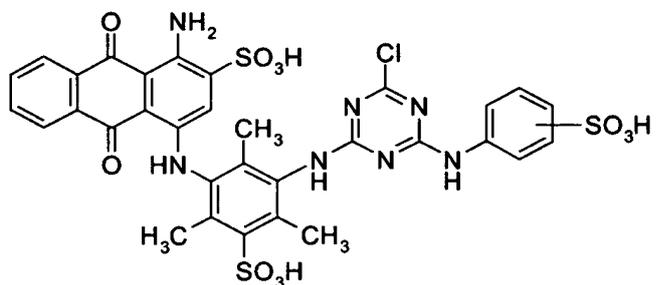


35

y

5

10

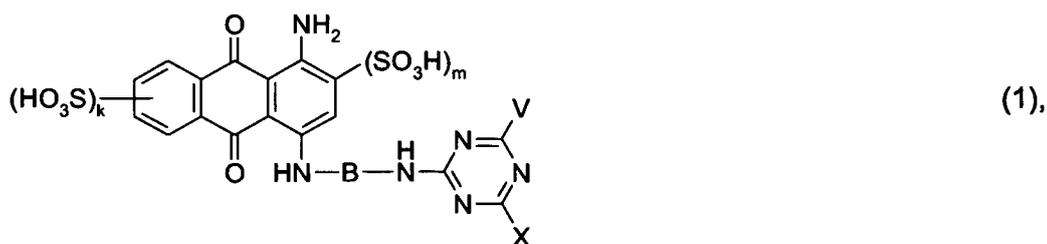


donde

Q es sulfo o carboxi.

15

6. Un proceso para la preparación de los adsorbentes de acuerdo con la reivindicación 5, proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula



en el cual

20

B es Radical C2-C12alquileo, que puede estar interrumpido por 1, 2 o 3 miembros del grupo consistente en -NR₁- o -O- y es no sustituido o sustituido por hidroxilo, sulfo, sulfato, ciano o carboxilo,

R₁ es hidrógeno o C₁-C₄alquilo, o

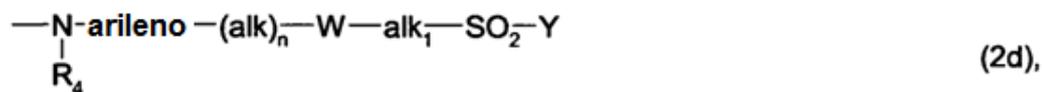
25

B es un radical C₅-C₉cicloalquileo, radical C₁-C₄alquilen-C₅-C₉cicloalquileo o radical C₁-C₄alquilen-C₅-C₉cicloalquilen-C₁-C₄alquileo, los cuales están no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, sulfo, halógeno o carboxilo, o un radical fenileno, radical C₁-C₄alquilen-fenileno o radical C₁-C₄alquilen-fenilen-C₁-C₄alquileo, los cuales están no sustituidos o sustituidos por C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi, C₂-C₄alcanoilamino, sulfo, halógeno o carboxilo,

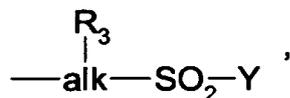
V es un sustituyente reactivo a materiales no fibrosos o es un sustituyente reactivo a la fibra de fórmula



30



5 donde
R₂ es hidrógeno o C₁-C₄ alquilo no sustituido o sustituido o un radical



10 R₃ es hidrógeno, hidroxilo, sulfato, sulfato, carboxilo, ciano, halógeno, C₁-C₄alcoxicarbonilo, C₁-C₄-alcanoiloxi, carbamoilo o un grupo -SO₂-Y,

R₄ es hidrógeno o C₁-C₄alquilo,

alk y alk₁ son independientemente uno del otro C₁-C₆ alquilenos lineales o ramificados,

15 arileno es un radical fenileno o naftileno el cual es no sustituido o sustituido por sulfato, carboxilo, hidroxilo, C₁-C₄alquilo, C₁-C₄alcoxi o por halógeno,

Y es vinilo o un radical -CH₂CH₂-U y U es un grupo saliente,

Y₁ es un grupo -CH(Hal)-CH₂(Hal) o -C(Hal)=CH₂ donde Hal es cloro o bromo,

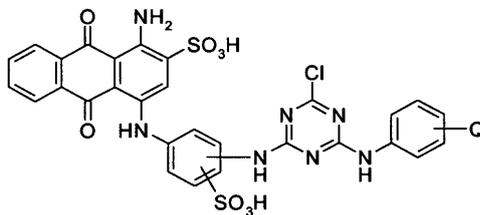
W es un grupo -SO₂-NR₄-, -CONR₄- o -NR₄CO- donde R₄ es como se definió más arriba,

20 Q es un radical -O- o -NR₄- donde R₄ es como se definió más arriba, y
n es un número 0 o 1,

X es halógeno, and

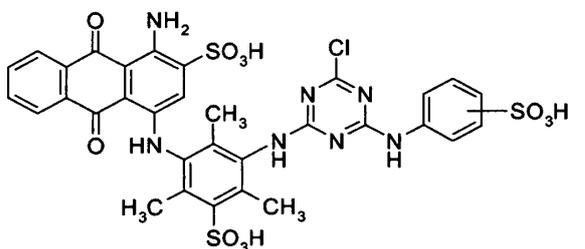
k y m son independientemente uno del otro un número 0 o 1 y la suma de k+m es 1 o 2, con la excepción de un compuesto de fórmula

5



y

10



15

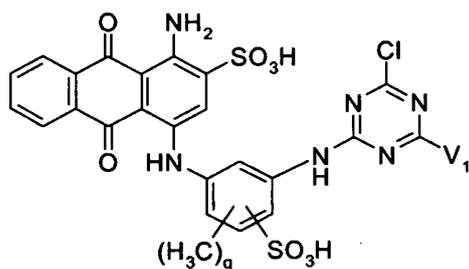
donde

Q es sulfo o carboxi,

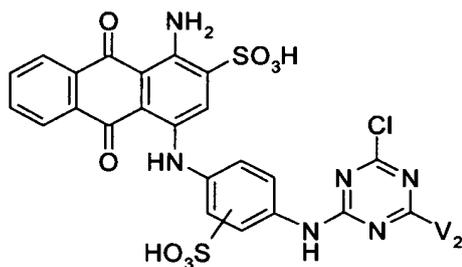
con un sustrato que tiene un grupo capaz de reaccionar con un grupo reactivo en dicho compuesto de fórmula (1) para formar un enlace covalente en la presencia de un agente enlazante de ácido.

7. Compuestos de la fórmulas

20

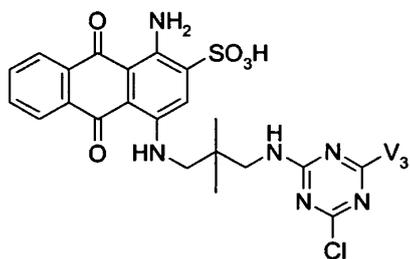


(3),



(4)

y



(5),

donde

V_1 is β -hidroxietilamino, 2-(β -hidroxietoxi)etilamino o morfolino,

5

V_2 y V_3 cada uno independientemente del otro son β -hidroxietilamino, 2-(β -hidroxietoxi)etilamino, N,N-di- β -hidroxietilamino o morfolino, y

Q es el número 0, 1, 2 o 3.

Fig. 1

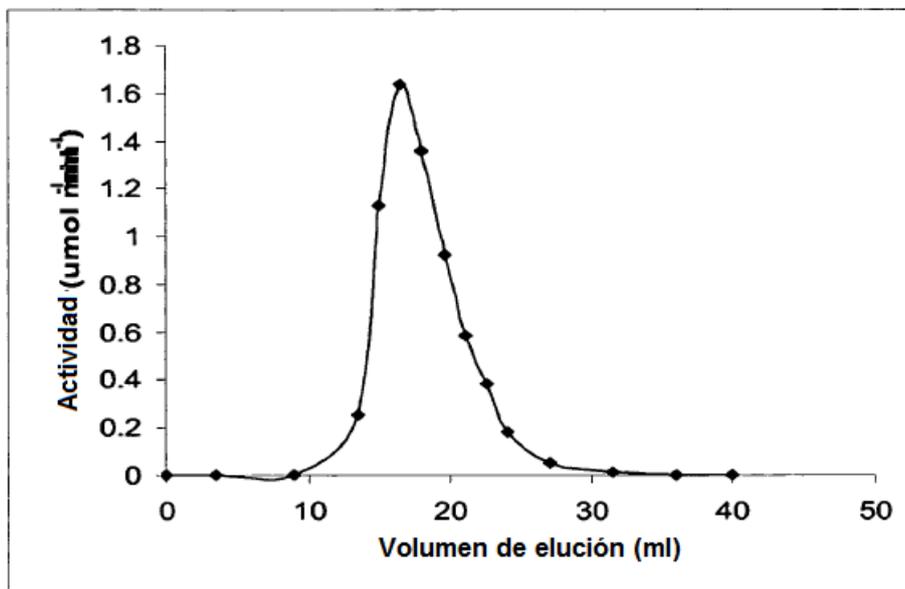


Fig. 2

